

Dr inż. Lidia Stasiak-Róžańska
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Wydział Nauk o Żywności

Autoreferat
z opisem osiągnięć naukowych związanych
z postępowaniem habilitacyjnym

Warszawa, 2019 r.

Spis treści

| | |
|---|----|
| 1. Dane osobowe | 3 |
| 2. Posiadane dyplomy, tytuły i stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej | 3 |
| 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych | 4 |
| 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789) | 5 |
| 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego | 5 |
| 4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego | 5 |
| 4.3. Omówienie celu naukowego publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania | 7 |
| 4.3.1. Wstęp | 7 |
| 4.3.2. Cel badań | 13 |
| 4.3.3. Wyniki | 13 |
| 4.3.4. Podsumowanie otrzymanych wyników i omówienie ich ewentualnego wykorzystania | 29 |
| 4.4. Spis literatury | 32 |
| 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych | 37 |
| 6. Omówienie działalności dydaktycznej oraz w zakresie popularyzacji nauki | 46 |

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Lidia Stasiak-Róžańska
Miejsce pracy: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Wydział Nauk o Żywności
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Nowoursynowska 159 c bud. 32, 02-776 Warszawa
Tel. +48 22 59 37 664, e-mail: lidia_stasiak@sggw.pl

2. Posiadane dyplomy, tytuły i stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 2012 r.** Stopień naukowy: **doktor** nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia
Tytuł rozprawy doktorskiej: Badania nad wykorzystaniem wybranych gatunków bakterii octowych do otrzymywania preparatu komórkowego o aktywności katalitycznej dehydrogenazy glicerolowej
Promotor: prof. dr hab. Stanisław Błażej
Wydział Nauk o Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
- 2010 r.** Podyplomowe Studia Doskonalenia Pedagogicznego
Świadectwo ukończenia jedno-semestralnych studiów podyplomowych nr SDP-716/2010
Wydział Nauk Humanistycznych
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
- 2006 r.** Tytuł zawodowy: **magister inżynier** w zakresie biotechnologii w przemyśle spożywczym
Tytuł pracy magisterskiej: Analiza funkcjonalna genu *yebF* kodującego hipotetyczny regulator transkrypcji u *Lactococcus lactis* IL 1403
Promotor: dr Tamara Aleksandrak-Piekarczyk
Międzywydziałowe Studium Biotechnologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

| | |
|---------------------------------|---|
| 12.2012 r. – obecnie | adiunkt naukowo-dydaktyczny Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydział Nauk o Żywności Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie |
| 12.2011 r. – 12.2012 r. | asystent naukowo-dydaktyczny Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydział Nauk o Żywności Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie |
| 06.2006 r. – 09. 2007 r. | pracownik naukowo-techniczny, wykonawca grantu Zakład Biochemii Drobnoustrojów Instytut Biochemii i Biofizyki Polska Akademia Nauk |

Przerwy w wykonywaniu obowiązków wynikających z zajmowanych stanowisk pracy:

- 23.10.2012 r. - 30.09.2013 r. - z tytułu urodzenia drugiego dziecka

- 31.01.2015 r. - 29.01.2016 r. - z tytułu urodzenia trzeciego dziecka

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789)

Osiągnięciem wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789) jest cykl pięciu publikacji powiązanych tematycznie.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Biotechnologiczne otrzymywanie dihydroksyacetonu z glicerolu odpadowego przy udziale bakterii octowych oraz koncepcja zastosowania tego związku w połączeniu z celulozą bakteryjną

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego

H1. Stasiak-Róžańska Lidia, Kupiec Milena, 2018, Industrial applications of wild and genetically-modified strains of acetic acid bacteria, Postępy Mikrobiologii, 57, 4, 398-402

IF₂₀₁₇: 0,354*

IF_{5-letni}: 0,354**

Punkty MNiSW: 15*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji manuskryptu, zgromadzeniu danych literaturowych, analizie danych literaturowych, przygotowaniu manuskryptu, redagowaniu manuskryptu, dostosowaniu manuskryptu do uwag Recenzentów, jestem autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 95%.

H2. Stasiak-Róžańska Lidia, Berthold-Pluta Anna, Dikshit Pritam Kumar, 2018, Valorization of waste glycerol to dihydroxyacetone with biocatalysts obtained from *Gluconobacter oxydans*, Applied Sciences, 8, 2517, DOI: 10.3390/app8122517

IF₂₀₁₇: 1,689*

IF_{5-letni}: 1,855

Punkty MNiSW: 25*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu badań wstępnych, niezbędnych do zrealizowania zamierzonego celu, opracowaniu metodyki badań, pozyskaniu funduszy na finansowanie badań (nr grantu 505-10-092800-N00398-99), nawiązaniu współpracy z dr. P. K. Dikshitem w celu przeprowadzenia eksperymentalnej części pracy oraz konsultacji naukowych w zakresie podjętej problematyki badawczej, przeprowadzeniu części badawczej, wiodącym udziale w opracowaniu i analizie wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu, wiodącym udziale w dostosowaniu manuskryptu do uwag Recenzentów, jestem autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H3. Stasiak-Róžańska Lidia, Błażej Stanislaw, Gientka Iwona, Bzducha-Wróbel Anna, Lipińska Edyta, 2017, Utilization of a waste glycerol fraction using and reusing immobilized *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 cell extract, Electronic Journal of Biotechnology, 27, 44-48, DOI: 10.1016/j.ejbt.2017.03.003

IF₂₀₁₇: 1,881IF_{5-letni}: 1,591

Punkty MNiSW: 15*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu badań, wiodącym udziale w opracowaniu i analizie wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu, wiodącym udziale w dostosowaniu manuskryptu do uwag Recenzentów, jestem autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 68%.

H4. Stasiak-Róžańska Lidia, Bzducha-Wróbel Anna, Berthold-Pluta Anna, 2018, Effect of the additive of pyrroloquinoline quinone on waste glycerol bioconversion to dihydroxyacetone, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 594, 59-67, DOI: 10.22630/ZPPNR.2018.594.26

IF₂₀₁₇: brakIF_{5-letni}: brak

Punkty MNiSW: 13*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki badań, wiodącym udziale w przeprowadzeniu części eksperymentalnej pracy, opracowaniu i analizie wyników, analizie danych literaturowych, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu, wiodącym udziale w dostosowaniu manuskryptu do uwag Recenzentów, jestem autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H5. Stasiak-Róžańska Lidia, Płoska Justyna, 2018, Study on the use of microbial cellulose as a biocarrier for 1,3-dihydroxy-2-propanone and its potential application in industry, Polymers, 10, 438, DOI: 10.3390/polym10040438

IF₂₀₁₇: 2,935*IF_{5-letni}: 3,509

Punkty MNiSW: 40*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu badań wstępnych, umożliwiających zaplanowanie dalszego postępowania eksperymentalnego, opracowaniu metodyki badań, wiodącym udziale w przeprowadzeniu części eksperymentalnej pracy, pozyskaniu grupy respondentów do badań, przygotowaniu ankiety do badań, opracowaniu i analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, dostosowaniu manuskryptu do uwag Recenzentów, jestem autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 95%.

*Punkty MNiSW oraz wartość IF z roku 2018 dla ww. czasopism nie zostały obliczone, w związku z czym podano dane za rok poprzedni (2017)

**w przypadku czasopism dla których nie naliczono 5-letniego wskaźnika IF przyjęto wartość IF z roku publikacji lub z roku poprzedniego w przypadku, gdy nie są dostępne wskaźniki z roku publikacji

Sumaryczna liczba IF oraz punktów MNiSW dla prac stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego:

IF: 6,859

IF_{5-letni}: 7,309

Punkty MNiSW: 108

Oświadczenia Współautorów prac wchodzących w skład osiągnięcia, określające Ich udział w powstanie tych prac stanowi załącznik 5.

4.3. Omówienie celu naukowego publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**4.3.1. Wstęp**

Dihydroksyaceton (DHA) to najprostsza ketotrioza, która w wyniku krystalizacji, przyjmuje postać białego, higroskopijnego proszku o słodkim, orzeźwiający smaku i charakterystycznym zapachu. W środowisku naturalnym DHA występuje w burakach cukrowych i trzcinie cukrowej [Stasiak-Róžańska i wsp. 2010, Stasiak-Róžańska i Błażej 2011]. DHA może być stosowany jako wzmacniacz zapachów w produktach poddanych obróbce termicznej, a także jako emulgator i plastyfikator. Związek ten jest łatwo przyswajalny przez organizm i może pełnić rolę substancji słodzącej oraz suplementu diety, który wywołuje silny efekt metaboliczny [Stasiak-Róžańska i wsp. 2011]. Wykazano, że DHA charakteryzuje się działaniem antagonistycznym przy zatruciu cyjankami [Niknahad i Ghelichkhani 2002, Cummings 2004]. Do ważnych zastosowań DHA należy również jego rola w otrzymywaniu metotreksatu - leku o działaniu przeciwnowotworowym [Black i Nair 2013]. DHA uczestniczy również w otrzymywaniu glikolu polietylenowego, który jest składnikiem antyperspirantów, past do zębów, a także produktów do higieny rąk [Stasiak-Róžańska i Błażej 2011, Stasiak-Róžańska i Błażej 2012]. Wśród mniej popularnych zastosowań DHA, ale wyraźnie wskazujących wszechstronny potencjał aplikacyjny tego związku, wymienić należy jego właściwości przeciwpasożytnicze. Dihydroksyaceton może hamować cykl glikolizy u zarodźca sierpowatego (*Plasmodium falciparum*), który jest jednym z czterech gatunków pierwotniaków, wywołujących malarię u ludzi [Pavlovic-Djuranovic i wsp. 2006]. Badania prowadzone przez Uzcátegui i wsp. [2007] wskazały znaczącą rolę DHA w projektowaniu nowych leków trypanobójczych. Wykazano, że DHA może hamować cykl komórkowy świdorca nagany (*Trypanosoma brucei*), odpowiedzialne-

go za wywoływanie nagany - choroby o dużej śmiertelności wśród zwierząt. Dihydroksyaceton może być również wykorzystywany w przygotowaniu biopotrunków stosowanych do tamowania krwi podczas zabiegów chirurgicznych [Henderson i wsp. 2010]. Ustalono również, że DHA odgrywa korzystną rolę w leczeniu niedociśnienia i wstrząsu kardiogenego, poprzez przywrócenie objętości krwi i oddychania komórkowego. Wyniki najnowszych badań wskazują na silnie terapeutyczny potencjał DHA w walce z zatruciami fosforem glinu, który jest toksycznym pestycydem [Ahmadi i wsp. 2018].

Niezmiennie od wielu lat największe zapotrzebowanie na DHA obserwuje się w przemyśle kosmetycznym [Stasiak-Róžańska i wsp. 2010, Stasiak-Róžańska i Błażej 2011]. Dihydroksyaceton jest głównym związkiem aktywnym, obecnym we wszystkich kosmetykach, nadających skórze kolor zbliżony do naturalnej opalenizny. To właśnie DHA warunkuje zmianę barwy skóry po aplikacji tzw. samoopalaczy [Stasiak-Róžańska i Błażej 2011, Braunberger i wsp. 2018]. Rosnąca świadomość konsumentów na temat szkodliwych skutków promieniowania UV, a także trend podtrzymywania opalenizny niezależnie od pory roku, wpływają na wzrost zapotrzebowania na kosmetyki samoopalające. W 2017 roku globalny rynek tych produktów wygenerował w Stanach Zjednoczonych dochód 1.011 mln \$. Dla porównania, światowe przychody z tego rynku w 2014 roku wynosiły około 775 mln \$, w Stanach Zjednoczonych rynek kosmetyków samoopalających wzrósł o 27% w 2016 roku (z 135 mln w 2011 r. do 171 mln w 2016 r.) i o kolejne 19% w 2017 r. [Ciriminna i wsp. 2018].

Istnieją dwie główne metody otrzymywania DHA: chemiczna i mikrobiologiczna [Stasiak-Róžańska i wsp. 2010, Stasiak-Róžańska i Błażej 2011].

Chemicznym sposobom otrzymywania DHA towarzyszy powstawanie związków ubocznych o potencjalnie negatywnym oddziaływaniu na środowisko naturalne. Główne wady produkcji DHA metodą chemiczną obejmują także duże nakłady energetyczne i ekonomiczne, związane z wieloetapowym oczyszczaniem produktu, a także nadoksydację DHA, co zazwyczaj wydłuża czas otrzymywania tego związku [Bianchi i wsp. 2005, Dimitratos i wsp. 2005, Ciriminna i wsp. 2006, Ciriminna i wsp. 2018].

Obecnie, kiedy wiele procesów chemicznych próbuje się zastąpić procesami bardziej przyjaznymi dla środowiska naturalnego, dużą uwagę przykładają się do rozwoju i ulepszania biotechnologicznych metod pozyskiwania związków stosowanych w przemyśle. Stąd też mikrobiologiczna produkcja DHA jest aktualnie jedyną dopuszczoną do stosowania metodą otrzymywania tej ketotriozy [Dubin i wsp. 2007]. Związana jest ona z metabolizowaniem

glicerolu przez wybrane gatunki bakterii octowych (Acetic Acid Bacteria, AAB) [Stasiak-Róžańska i wsp. 2011].

Utlenianie glicerolu w komórkach AAB może przebiegać w dwóch szlakach. Pierwszy, tzw. szlak komórkowy, zachodzi w środowisku o pH 8,5-10,0 na terenie cytosolu komórkowego i jest zależny od obecności adenosynotryfosforanu (ATP) oraz jonów Mg^{2+} . Glicerol ulega licznym przekształceniom i ostatecznie jest włączany w proces produkcji biomasy komórkowej. Drugi szlak utleniania glicerolu przebiega w przestrzeni peryplazmatycznej komórek, w pH 5,0-5,5 i jest to szlak niezależny od ATP i NAD (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego). Glicerol ulega wówczas bezpośredniemu utlenianiu do DHA, który jest uwalniany do środowiska zewnętrznego komórki. Reakcja ta katalizowana jest przez dehydrogenazę glicerolową (GlyDH) - enzym związany z błoną komórkową bakterii, którego aktywność uzależniona jest od pirolochinolinochinonu (PQQ) [Stasiak-Róžańska i wsp. 2010, Stasiak-Róžańska i Błazejak 2012, Mamlouk i Gullo 2013].

Proces mikrobiologicznego otrzymywania DHA przebiega w podłożach bogatych w składniki odżywcze, które są niezbędne do zapewnienia optymalnych warunków wzrostu i aktywności metabolicznej bakterii octowych. Odzyskiwanie DHA z mieszaniny poreakcyjnej jest procesem wieloetapowym i utrudnionym przez obecność pozostałości składników podłoża oraz innych niż DHA metabolitów AAB. Otrzymywanie DHA z udziałem wybranych szczepów bakterii octowych przebiega w warunkach optymalnych dla aktywności metabolicznej tych mikroorganizmów (temperatura 28°C, pH 5,0-5,5), a są to parametry odbiegające od optymalnych warunków działania dehydrogenazy glicerolowej (temperatura 23°C, pH 7,0-7,5), która katalizuje utlenianie glicerolu do DHA [Lapenaite i wsp. 2005].

Do głównych i najważniejszych problemów technologicznych efektywnego otrzymywania dihydroksyacetonu metodą mikrobiologiczną należy m.in. długotrwały proces namnażania komórek bakterii, który wymaga stałej kontroli parametrów hodowlanych [Stasiak-Róžańska i wsp. 2014]. Niezbędna jest również wcześniejsza aktywacja dehydrogenazy glicerolowej, poprzez dodatek do podłoża określonej dawki glicerolu. Kolejnym poważnym ograniczeniem mikrobiologicznego utleniania glicerolu do DHA jest zjawisko hamowania aktywności metabolicznej mikroorganizmów, spowodowane niewłaściwie dobranym początkowym stężeniem substratu oraz wzrastającym stężeniem powstającego produktu [Stasiak-Róžańska i wsp. 2014]. Warto zatem podejmować starania nad ulepszeniem biotechnologicznych sposobów otrzymywania dihydroksyacetonu.

W ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się niepokojący wzrost zapotrzebowania na energię. Analitycy Międzynarodowej Agencji Energetycznej podają kilka przyczyn tego zjawiska [www.iea.org]. Wśród nich wymieniają m.in. światowy rozwój gospodarki, który wynosi średnio 3,4% w skali roku, oraz ciągły wzrost liczby ludności (szacuje się, że liczba ludności w 2040 roku przekroczy 9 mld, przy szacunkowej liczbie 7.4 mld w 2018 roku). Według tej Agencji w samych Chinach do 2040 roku zapotrzebowanie np. na energię elektryczną, służącą tylko do chłodzenia, przekroczy całe obecne zapotrzebowanie na prąd w Japonii. W świetle tych prognoz zauważa się również, że era węgla, ropy i innych paliw kopalnych dobiega końca. Odpowiedzią na kurczące się zasoby ropy naftowej miało być wprowadzenie na rynek biopaliw odnawialnych, otrzymywanych z przetwórstwa biomasy – tłuszczów roślinnych, zwierzęcych i mikroorganizmów [Hayyan i wsp. 2013, Maravi i wsp. 2016]. Jednak takie rozwiązanie przyczyniło się do wygenerowania poważnego problemu środowiskowego – produktu ubocznego w postaci glicerolu odpadowego.

Proces produkcji biodiesla zawsze związany jest z powstawaniem glicerolu odpadowego. Na każde 100 ton wyprodukowanego biodiesla, powstaje ponad 10 ton tego odpadu [Manara i Zabaniotou 2016, Binhayeeding i wsp. 2017]. Sytuacja jest niepokojąca, zważywszy, że globalną produkcję biodiesla w 2016 roku oszacowano na 33 mln ton, czyli o 3.3 mln ton więcej niż w 2015 roku. Oznacza to jednoczesne wytworzenie ponad 3.3 mln ton glicerolu odpadowego. Produkcja biopaliw w krajach Unii Europejskiej, jak również na całym świecie dynamicznie rośnie dlatego też ilość glicerolu odpadowego zwiększa się z roku na rok [Vasudevan i Fu 2010].

Oczyszczenie glicerolu odpadowego do stopnia, który umożliwia bezpiecznie stosowanie go w przemyśle spożywczym, farmacji czy medycynie, jest bardzo drogie i przez to komercyjnie mało opłacalne [Diaz i wsp. 2003]. Częściowo oczyszczony glicerol odpadowy może być stosowany np. jako dodatek do pasz dla zwierząt [Nitayavardhana i Khanal 2011, Quispe i wsp. 2013]. Może stanowić również wartościowy energetycznie dodatek do produkcji peletów opałowych [Bala-Litwiniak i Radomiak 2018]. Możliwość zagospodarowania kłopotliwej frakcji glicerynowej obejmuje także produkcję niektórych związków chemicznych, dodatków paliwowych, produkcję wodoru, etanolu i metanolu [Leoneti i wsp. 2012].

Większość opracowanych metod utylizacji glicerolu odpadowego opiera się głównie na badaniach prowadzonych w skali laboratoryjnej. Istnieje ciągła i niezaspokojona potrzeba opracowywania nowych rozwiązań i propozycji waloryzacji tego odpadu, które będzie można zastosować w skali przemysłowej i tym samym chronić środowisko naturalne [Anand

i Saxena 2012, Yang i wsp. 2012]. Do tej pory udało się opracować m.in. laboratoryjną metodę utylizacji glicerolu do propano-1,3-diolu z zastosowaniem bakterii z gatunku *Citrobacter freundii* [Hiremath i wsp. 2011]. Podobne badania z sukcesem przeprowadzono z wykorzystaniem bakterii z gatunków *Klebsiella pneumoniae* i *Clostridium butyricum* [Mu i wsp. 2008, Chatzifragkou i wsp. 2011]. Podejmowano również próby transformacji odpadu glicerynowego do etanolu, kwasu cytrynowego i biopoliestrów [Ito i wsp. 2005, Papanikolaou i Aggelis 2009, Chanprateep 2010]. Glicerol odpadowy można także przekształcać do DHA z wykorzystaniem bakterii octowych [Stasiak-Róžańska i wsp. 2010]. Mikrobiologiczne utlenianie glicerolu do DHA z jednej strony umożliwia pozbycie się kłopotliwego odpadu, a z drugiej strony otrzymanie dihydroksyacetonu – związku o dużym potencjale aplikacyjnym [Stasiak-Róžańska i wsp. 2014].

Od kilku lat w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW w Warszawie prowadzone są badania nad opracowaniem skutecznej metody biotransformacji glicerolu do DHA z zastosowaniem wybranych gatunków bakterii octowych. Badania rozpoczęto od ustalenia, które gatunki AAB wykazują aktywność GlyDH [Stasiak-Róžańska 2012]. Do początkowych testów wybrano bakterie *Acetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter xylinus* oraz *Gluconobacter oxydans*. Na podstawie serii hodowli doświadczalnych oraz zdolności przeprowadzania przez te bakterie utleniania glicerolu do DHA, wybrano dwa gatunki, które poddano dalszym badaniom. W prowadzonych pracach doświadczalnych oprócz wolnych komórek AAB zastosowano również immobilizację [Stasiak-Róžańska 2012].

Immobilizacja polega na unieruchomieniu materiału biologicznego wewnątrz lub na powierzchni nośnika w sposób, który pozwala na zachowanie jego aktywności katalitycznej [Dembczyński i Jankowski 2004, Stasiak-Róžańska i Błażej 2012]. Immobilizacja umożliwia m.in. łatwe oddzielenie unieruchomionego materiału biologicznego od środowiska reakcji, w którym znajduje się oczekiwany produkt. Immobilizacja pozwala również na skrócenie wielu procesów poprzez wyeliminowanie etapów filtracji, wirowania czy destylacji mediów poprodukcyjnych. Stosowanie unieruchomionych komórek lub enzymów umożliwia często kilkukrotne zastosowanie ich w procesach technologicznych, co pozwala na obniżenie kosztów przeprowadzanych reakcji. Unieruchomione biokatalizatory nie zanieczyszczają środowiska reakcyjnego, a struktura nośnika skutecznie chroni je przed uszkodzeniami mechanicznymi, zmianami temperatury czy pH środowiska reakcyjnego, a także stresem związanym z mieszaniem i napowietrzaniem podłoża [Dembczyński i Jankowski 2004, Kumaravel i Gopal 2010, Stasiak-Róžańska i Błażej 2012]. Dodatkową zaletą stosowania

immobilizowanych biokatalizatorów jest znaczne ograniczenie zmian gęstości i lepkości środowiska reakcyjnego, co może mieć kluczowe znaczenie dla wielu procesów technologicznych [Bakuła i wsp. 2013].

W badaniach, zmierzających do opracowania skutecznej metody utleniania glicerolu do DHA, zastosowano immobilizowane komórki *Gluconacetobacter xylinus* [Stasiak-Róžańska i wsp. 2010], a reakcję przeprowadzono w podłożach hodowlanych, zawierających m.in. ekstrakt drożdżowy, siarczan amonu i glicerol techniczny. Wykazano, że na proces biotransformacji glicerolu do DHA, przebiegający z zastosowaniem immobilizowanych komórek *Ga. xylinus*, istotny wpływ miały zastosowane dawki glicerolu, czas prowadzenia reakcji, a także pH środowiska reakcyjnego [Stasiak-Róžańska i wsp. 2010]. Chociaż wskazano na możliwość otrzymywania DHA z zastosowaniem unieruchomionych komórek *Ga. xylinus*, to jednak metoda ta nie eliminowała zjawiska hamowania aktywności metabolicznej komórek, wywołanego obecnością substratu i produktu w środowisku reakcji [Stasiak-Róžańska i wsp. 2011].

Podjęto także próby zwiększenia zdolności wytwarzania DHA przez bakterie z gatunku *Ga. xylinus* za pomocą mutagenizacji promieniowaniem UV [Błażej i wsp. 2011]. W wyniku przeprowadzonych testów fenotypowych otrzymanych mutantów, wybrano szczepy, które wykazywały zwiększoną (w porównaniu do szczepów rodzicielskich) zdolność utleniania glicerolu do DHA. Jednak zmiany genetyczne, niosące pozytywne efekty fenotypowe, przyczyniły się jednocześnie do zahamowania podziałów komórkowych otrzymanych mutantów co uniemożliwiło kontynuowanie tych badań [Błażej i wsp. 2011].

Kolejne próby opracowania biotechnologicznej metody utleniania glicerolu do DHA przebiegały z zastosowaniem gatunku *G. oxydans* i różniły się od wcześniejszych badań tym, że środowisko reakcji w postaci bogatych w składniki odżywcze podłoża mikrobiologicznych, zastąpiono wodnymi roztworami glicerolu technicznego. Dodatkowo, oprócz całych, żywych komórek *G. oxydans*, po raz pierwszy w tego rodzaju badaniach, zastosowano preparat komórkowy, który wykazywał aktywność dehydrogenazy glicerolowej [Stasiak-Róžańska i wsp. 2014]. Wyniki przeprowadzonych badań wyznaczyły nowy kierunek prac nad biotechnologicznymi sposobami otrzymywania DHA. Na ich podstawie powstał pomysł opracowania biotechnologicznej metody utylizacji glicerolu odpadowego do dihydroksy-acetonu z zastosowaniem immobilizowanego preparatu komórkowego o aktywności katalitycznej dehydrogenazy glicerolowej.

4.3.2. Cel badań

Nadrzędnym celem badań, stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789), było

opracowanie biotechnologicznej metody otrzymywania dihydroksyacetonu z glicerolu odpadowego przy udziale bakterii octowych oraz wskazanie nowej koncepcji przemysłowego zastosowania tego związku w połączeniu z celulozą bakteryjną.

4.3.3. Wyniki

Pierwszy etap pracy polegał na poszerzeniu i ugruntowaniu wiedzy na temat m.in. możliwości wykorzystania potencjału biochemicznego bakterii octowych w wybranych procesach technologicznych, a także ułatwił zaplanowanie części eksperymentalnej. W publikacji przeglądowej **H1 Stasiak-Róžańska L., Kupiec M., 2018, Industrial applications of wild and genetically-modified strains of acetic acid bacteria, Postępy Mikrobiologii, 57, 4, 398-402**, przedstawiono m.in. tradycyjne kierunki przemysłowego zastosowania bakterii octowych, wskazano również zastosowania genetycznie zmodyfikowanych szczepów tych bakterii.

Bakterie kwasu octowego, nazywane również bakteriami octowymi (AAB - Acetic Acid Bacteria), należą do rodziny *Acetobacteriaceae*. Do najbardziej znanych i dobrze scharakteryzowanych rodzajów AAB zaliczane są m.in. *Acetobacter*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* oraz *Komagataeibacter* [H1, Stasiak i Błażej 2009]. Bakterie octowe to Gram-ujemne, tlenowe chemoorganotrofy, dla których optymalna temperatura wzrostu wynosi 25-35°C, a optymalne pH obejmuje zakres 5,4-6,3 [H1]. Charakterystyczną cechą wszystkich bakterii octowych jest tworzenie kwasów, które powstają jako końcowe lub przejściowe produkty utleniania alkoholi oraz węglowodanów [H1, Gomes i wsp. 2018].

Oprócz niepodważalnie pozytywnego znaczenia bakterii octowych w przemyśle spożywczym, mikroorganizmy te mogą być niekiedy przyczyną zaocowania piw oraz win. Bakterie octowe mogą także psuć smak marynat warzywnych i owocowych oraz utrudniać proces produkcji drożdży piekarskich [Stasiak i Błażej 2009, Mamlouk i Gullo 2013, Wang i wsp. 2015, Attchelouwa i wsp. 2018].

Jak zaznaczono w publikacji H1, do najważniejszych związków otrzymywanych przy udziale bakterii octowych zalicza się kwas octowy (ocet), celulozę bakteryjną, dihydroksy-aceton, a także kwas glukonowy i lewan.

Do otrzymywania octu wykorzystuje się gatunki z rodzaju *Komagataeibacter*, roczna produkcja tego związku na świecie wynosi ok. 7 mln ton, z czego ponad połowa pochodzi z fermentacji przeprowadzanej przez bakterie octowe [Valera i wsp. 2015; Coelho i wsp. 2017, Yin i wsp. 2017]. Ocet wykorzystywany jest głównie do konserwowania żywności oraz poprawy i wzmocnienia smaku potraw [H1].

W publikacji H1 podkreślono, że szczególnie ważną pozycję wśród metabolitów bakterii octowych zajmują celuloza bakteryjna i dihydroksyaceton.

Celuloza bakteryjna (CB) jest liniowym biopolimerem, zbudowanym z łańcuchów β -1,4-glukanu, połączonych wiązaniami wodorowymi. Nanowłókna celulozy bakteryjnej są około 100 razy mniejsze w porównaniu z włóknami celulozy roślinnej i bardziej uporządkowane przestrzennie w porównaniu do roślinnego odpowiednika. Celuloza pochodzenia mikrobiologicznego jest wytrzymała na uszkodzenia mechaniczne i nie zawiera hemicelulozy, co ułatwia i usprawnia przygotowanie jej do późniejszego zastosowania w przemyśle [H1]. CB została uznana przez Food and Drug Administration (FDA) w 1992 roku za związek bezpieczny dla zdrowia i życia człowieka. Ze względu na szerokie zastosowanie oraz możliwość mikrobiologicznej syntezy w nieograniczonych ilościach, bakteryjna celuloza nazywana jest „biopolimerem przyszłości” [H1]. Może być wykorzystywana m.in. w przemyśle spożywczym, papiernictwie, biologii molekularnej, implantologii, stomatologii, okulistyce, otolaryngologii, chirurgii plastycznej oraz kosmetyce [Czaja i wsp. 2007, Lee i wsp. 2013, Kowalska-Ludwicka i wsp. 2013, Lin i Dufresne 2014, Gullo i wsp. 2018]. Celuloza bakteryjna jest nietoksyczna i nie reaguje z substancjami zawartymi w żywności. Zachowuje stabilność w szerokim zakresie pH i temperatury, dlatego może być stosowana do wytwarzania opakowań, które mają kontakt z żywnością, a także jako niskokaloryczny i bezsmakowy zamiennik tłuszczu w żywności. Wysoka stabilność termiczna CB podczas wielokrotnego zamrażania i rozmrażania, umożliwia zastosowanie tego biopolimeru jako dodatku do mrożonych produktów spożywczych. Celuloza bakteryjna jest stabilnym i wielofunkcyjnym materiałem, który, jeśli nie jest zagospodarowany, ulega biodegradacji bez pozostawiania związków szkodliwych dla środowiska. Zastosowania CB wciąż są poszerzane, a zapotrzebowanie na ten związek stale rośnie [H1, Feng i wsp. 2015].

Dihydroksyaceton (DHA, 1,3-dihydroxy-2-propanon) jest jednym z podstawowych produktów pośrednich metabolizmu glicerolu m.in. w komórkach bakterii octowych. Mikroorganizmy te zdolne są do prowadzenia efektywnego utleniania glicerolu z wytworzeniem DHA, a reakcja katalizowana jest przez związaną z błoną cytoplazmatyczną bakterii dehydrogenazę glicerolową (GlyDH). Jak podkreślono w publikacji H1,

dihydroksyaceton jest składnikiem aktywnym wszystkich kosmetyków, które po aplikacji na skórę wywołują jej przejściowe brązowienie, imitujące naturalną opaleniznę. W wielu ośrodkach naukowych podejmowane są prace nad zwiększeniem efektywności procesu utleniania glicerolu do DHA z zastosowaniem bakterii octowych, w tym także próby wykorzystania genetycznie zmodyfikowanych szczepów AAB. Bakterie z gatunku *G. oxydans* wytwarzają jednocześnie DHA i kwas glicerynowy w reakcjach katalizowanych przez dehydrogenazę glicerolową i dehydrogenazę alkoholową. W publikacji H1 przytoczono badania, które wykazały, że mutant *G. oxydans* pozbawiony genu kodującego dehydrogenazę alkoholową (*ΔadhA*) może nabyć cechy umożliwiające wzrost w środowisku o wysokim stężeniu glicerolu (150 gL^{-1}) oraz do wydajnej produkcji DHA, w przeciwieństwie do szczepów dzikich [H1]. W publikacji H1 przedstawiono szereg badań opisujących zastosowanie genetycznie zmodyfikowanych bakterii octowych w przemyśle jako alternatywę dla tradycyjnych procesów pozyskiwania określonych związków. Publikacja przeglądowa H1 kończy się jednak konkluzją, która w moim odczuciu pozostaje aktualna. Opinia konsumentów, w sprawie stosowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie do pozyskiwania różnych związków jest podzielona. Na podstawie przytoczonych badań a także opinii konsumentów, przedstawionych w publikacji H1 stwierdzono, że społeczeństwo oczekuje raczej opracowywania nowych, skutecznych metod pozyskiwania określonych związków, które angażowałyby mikroorganizmy niezmienione metodami inżynierii genetycznej, aniżeli konstruowania mutantów. Podsumowanie literatury naukowej, stanowiącej podstawę do napisania artykułu H1, umocniło mnie w przekonaniu, że warto podjąć badania nad opracowaniem biotechnologicznej metody pozyskiwania DHA z zastosowaniem biokatalizatorów pochodzących z dzikich szczepów AAB.

Drugi etap pracy, opisany w publikacji **H2 Stasiak-Róžańska L., Berthold-Pluta A., Dikshit P.K., 2018, Valorization of waste glycerol to dihydroxyacetone with biocatalysts obtained from *Gluconobacter oxydans*, Applied Sciences, 8, 2517**, obejmował badania przeprowadzone z zastosowaniem szczepu *Gluconobacter oxydans* ATCC 621, który według moich wcześniejszych badań [Stasiak-Róžańska 2012] charakteryzował się wysoką aktywnością dehydrogenazy glicerolowej (GlyDH) – enzymu związanego z błoną komórkową bakterii octowych, którego działanie zależne jest od obecności kofaktora PQQ.

Zaplanowano przeprowadzenie biotransformacji glicerolu odpadowego do DHA z zastosowaniem czterech różnych biokatalizatorów, którymi były:

- całe, żywe komórki *G. oxydans* ATCC 621
- immobilizowane, całe, żywe komórki *G. oxydans* ATCC 621

- preparat komórkowy, który otrzymano z komórek *G. oxydans* ATCC 621, i który wykazywał aktywność GlyDH
- immobilizowany preparat komórkowy, który otrzymano z komórek *G. oxydans* ATCC 621, i który wykazywał aktywność GlyDH

Do przygotowania biokatalizatorów reakcji, każdorazowo wykorzystywano 1 g mokrej biomasy komórek *G. oxydans*, które po etapie namnożenia poddawano jeszcze hodowli aktywującej GlyDH. Preparat komórkowy otrzymywano w wyniku sonikacji komórek *G. oxydans*. Immobilizację materiału biologicznego przeprowadzano z zastosowaniem soli sodowej kwasu alginowego (alginianu sodu, E 401), która jest nośnikiem popularnym, bezpiecznym i dopuszczonym do stosowania w przemyśle spożywczym. Biotransformację przeprowadzono w wodnych roztworach glicerolu odpadowego, który pochodził z zakładów przemysłowej produkcji biodiesla. Stężenie odpadowego glicerolu ustalono na podstawie wcześniejszych badań [Stasiak-Róžańska i Błażej 2012] i wynosiło ono 30 lub 50 gL⁻¹. Biotransformację z udziałem wolnych lub immobilizowanych komórek *G. oxydans* prowadzono w warunkach optymalnych dla zachowania wysokiej aktywności metabolicznej szczepu, tj. w temperaturze 28°C i pH 5.0. Natomiast biotransformację z udziałem preparatu komórkowego o aktywności katalitycznej GlyDH (wolnego lub immobilizowanego) prowadzono w warunkach, które były optymalne dla zachowania wysokiej aktywności dehydrogenazy glicerolowej, tj. w temperaturze 23°C i pH 7,5.

Na podstawie przeprowadzonych badań, opisanych w publikacji H2, określono stopień wykorzystania glicerolu odpadowego w czasie reakcji, przyrost zawartości DHA w roztworach reakcyjnych, wydajność biotransformacji, współczynniki konsumpcji glicerolu, współczynniki produkcji DHA oraz plon powstającego DHA dla wszystkich rodzajów zastosowanych biokatalizatorów oraz warunków reakcji.

Biotransformacja glicerolu odpadowego o początkowym stężeniu **30 gL⁻¹ z zastosowaniem wolnych komórek *G. oxydans* ATCC 621** spowodowała znaczne zmniejszenie stężenia substratu (do ok. 11 gL⁻¹) już po pierwszej dobie procesu. Dalsze prowadzenie biotransformacji spowodowało zmniejszenie zawartości tego związku do ok. 1 gL⁻¹ po 48 godzinach. W tym samym procesie stężenie otrzymanego DHA wynosiło 9 gL⁻¹ po 24 godzinach i wzrosło dwukrotnie po kolejnej dobie. Najwyższe stężenie oczekiwanego produktu wynosiło ok. 20 gL⁻¹ i zostało odnotowane po 72 godzinach biotransformacji.

Biotechnologiczne utlenianie glicerolu odpadowego o początkowym stężeniu **30 gL⁻¹ z zastosowaniem immobilizowanych komórek *G. oxydans* ATCC 621** przebiegało wolniej

w porównaniu do procesu z zastosowaniem wolnych komórek tego szczepu. W przypadku immobilizowanego wariantu biokatalizatora stężenie substratu, wynoszące 1 gL^{-1} , zaobserwowano dopiero po upływie 72 godzin procesu. Stężenie dihydroksyacetonu było mniejsze w poszczególnych punktach pomiarowych w porównaniu z biotransformacją prowadzoną w tych samych warunkach, ale z użyciem wolnych komórek bakterii octowych. Najwyższe stężenie DHA w procesie z immobilizowanymi komórkami wynosiło $14,6 \text{ gL}^{-1}$ (po 72 godzinach).

W podłożu z początkowym stężeniem glicerolu odpadowego wynoszącym **50 gL^{-1}** i zastosowaniem wolnych komórek *G. oxydans* ATCC 621 stężenie substratu ulegało obniżeniu tylko w trakcie pierwszych 48 godzin procesu i osiągnęło wartość ok. $22,5 \text{ gL}^{-1}$. Stężenie DHA wzrastało sukcesywnie i wynosiło około 9 i 21 gL^{-1} , odpowiednio po 24 i 72 godzinach biotransformacji.

W trakcie pierwszych dwóch dni procesu utleniania glicerolu o stężeniu **50 gL^{-1}** z zastosowaniem immobilizowanych komórek *G. oxydans* ATCC 621, zużycie glicerolu zachodziło wolniej w porównaniu z reakcją w podłożu o tej samej początkowej zawartości substratu, lecz z komórkami wolnymi. Jednak pewne różnice w przebiegu tych reakcji były obserwowane po 72 i 96 godzinach, kiedy to zauważono, że stężenie glicerolu było niższe niż w reakcji z wolnymi komórkami odpowiednio o 3 i 4 gL^{-1} . Najwyższe stężenie DHA otrzymane w tym wariantcie eksperymentalnym wynosiło 16 gL^{-1} (po 96 godzinach).

Biotransformacja glicerolu odpadowego o początkowym stężeniu **30 gL^{-1}** z zastosowaniem wolnego preparatu komórkowego umożliwiła zużycie jedynie 5 g substratu na litr podłoża w ciągu pierwszej doby. Dalsze prowadzenie reakcji umożliwiło nieco większe zużycie tego związku, którego zawartość po zakończeniu reakcji wynosiła 13 gL^{-1} . W przypadku tego wariantu reakcji zauważono znaczny przyrost stężenia oczekiwanego produktu, do wartości ok. 13 gL^{-1} po 48 godzinach. Dalsze prowadzenie reakcji spowodowało wzrost zawartości DHA o 3 gL^{-1} .

Proces utleniania glicerolu do DHA, przebiegający w roztworze o początkowej zawartości substratu **30 gL^{-1}** z zastosowaniem immobilizowanego preparatu komórkowego, umożliwił otrzymanie mniejszych zawartości DHA (ok. 6 i 8 gL^{-1} odpowiednio po 48 i 96 godzinach) w porównaniu z procesem wykorzystującym wolny preparat. Stężenie glicerolu w tej reakcji pozostawało wyższe (ok. 22 i 20 gL^{-1} odpowiednio po 48 i 96 godzinach) w porównaniu do procesu przebiegającego z użyciem preparatu komórkowego, którego nie poddano immobilizacji.

Reakcja prowadzona w podłożu zawierającym odpad glicerolowy o stężeniu 50 gL^{-1} i z zastosowaniem wolnego preparatu komórkowego charakteryzowała się niskim zużyciem substratu (zaledwie 5 i $7,5 \text{ gL}^{-1}$ po 24 i 48 godzinach). Otrzymane stężenie DHA sukcesywnie wzrastało w podłożu wraz z upływem czasu, jednak nie było satysfakcjonujące i wynosiło zaledwie 4, 9 i 15 gL^{-1} odpowiednio po 24, 72 i 96 godzinach reakcji.

Podobny przebieg procesu zaobserwowano w podłożu z zawartością glicerolu 50 gL^{-1} i immobilizowanym preparatem komórkowym. Po 96 godzinach biotransformacji w podłożu nadal pozostawała znaczna część glicerolu odpadowego (około 28 gL^{-1}), a najwyższe stężenie DHA otrzymane w tym wariantcie reakcji wynosiło ok. 6 gL^{-1} .

Najwyższa wydajność biotransformacji prowadzonej z zastosowaniem komórek wolnych wynosiła 77% (w roztworze z 5% dodatkiem odpadowego glicerolu), natomiast z zastosowaniem komórek immobilizowanych 58% (również w podłożu reakcyjnym zawierającym 5% substratu). Najwyższa wydajność biotransformacji glicerolu, przebiegająca z zastosowaniem wolnego preparatu komórkowego, wynosiła prawie 100% (w roztworze z 3% zawartością glicerolu) oraz 98% (w roztworze z 5% zawartością glicerolu). Immobilizacja preparatu komórkowego zastosowanego w reakcji biotransformacji 3% roztworu glicerolu wpływała na nieznaczne zmniejszenie efektywności procesu (do 90% po 72 godzinach), a w przypadku zastosowania wyższego stężenia glicerolu (50 gL^{-1}) powodowała znaczne obniżenie wydajności reakcji (poniżej 30%).

Analizując wszystkie wyniki uzyskane w tym etapie doświadczeń i opisane w publikacji H2, można zaobserwować, że współczynnik konsumpcji glicerolu był największy w reakcjach, które przebiegały z użyciem żywych komórek *G. oxydans* ATCC 621. Wartości te wynosiły po 24 godzinach $0,78 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ w podłożu z 3% roztworem glicerolu oraz wolnymi komórkami, $0,58 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ w podłożu z 3% roztworem glicerolu oraz unieruchomionymi komórkami, $0,73 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ w reakcji z 5% roztworem glicerolu oraz wolnymi komórkami oraz po 48 godzinach $0,52 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ w reakcji z 5% roztworem glicerolu oraz unieruchomionymi komórkami. W tym samym czasie współczynniki zużycia glicerolu w reakcjach z preparatem komórkowym (niezależnie od stężenia glicerolu oraz unieruchomienia preparatu) wynosiły od 0,2 do $0,3 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Jakkolwiek plon otrzymanego dihydroksyacetonu był niepodważalnie wyższy w reakcjach prowadzonych z użyciem wolnego lub immobilizowanego preparatu komórkowego (w roztworze o początkowym stężeniu glicerolu 30 gL^{-1}) a także w reakcjach prowadzonych z użyciem wolnego preparatu komórkowego w 5% roztworze glicerolu odpadowego (od 0,83 do $0,97 \text{ gg}^{-1}$, podczas gdy dla komórek wolnych lub immobilizowanych wartość ta nie przekroczyła $0,7 \text{ gg}^{-1}$).

W żadnej z przeprowadzonych reakcji utleniania glicerolu odpadowego do DHA substrat nie został całkowicie wykorzystany. Glicerol zużyty podczas reakcji nigdy nie był całkowicie przekształcony w oczekiwany produkt. Najprawdopodobniej w reakcjach z zastosowaniem wolnych komórek *G. oxydans* część glicerolu odpadowego została wykorzystana na przyrost biomasy komórkowej. W komórkach szczepu *G. oxydans* ATCC 621, oprócz dehydrogenazy glicerolowej, występuje co najmniej osiem innych, związanych z błoną komórkową dehydrogenaz, które mogą przekształcać glicerol w inne niż DHA związki (np. glicerynian sodu). Enzymy te mogły być również obecne w preparacie komórkowym. Przepuszczalnie część glicerolu mogła stanowić substrat w reakcjach katalizowanych przez te enzymy [Erni i wsp. 2006, Peters i wsp. 2013, Mientus i wsp. 2017, Peters i wsp. 2017].

Jak wykazano w publikacji H2, wyższe początkowe stężenie glicerolu odpadowego (50 gL^{-1}) nie powodowało otrzymywania większych stężeń DHA, a w niektórych wariantach przeprowadzonej biotransformacji wręcz ograniczało plon produktu. Prawdopodobnie zwiększenie początkowego stężenia substratu spowodowało jednocześnie wzrost stężenia zanieczyszczeń obecnych w odpadzie glicerynowym, takich jak metanol, sole, mydła, reszkowe kwasy tłuszczowe, których obecność w mieszaninie reakcyjnej mogła powodować hamowanie właściwego procesu utleniania glicerolu do DHA [Chatzifragkou i Papanikolaou 2012]. Na tej podstawie stwierdzono, że w dalszym planowaniu podobnych badań należy stosować 3% początkowe stężenie odpadu glicerynowego.

Z przeprowadzonych badań wynikało, że immobilizacja może w pewnym stopniu obniżać ogólną wydajność biotransformacji glicerolu do DHA, jakkolwiek najwyższy plon produktu otrzymano właśnie z zastosowaniem unieruchomionego preparatu komórkowego [H2]. Na podstawie analizy wyników badań opisanych w publikacji H2, postawiłam hipotezę, że zmniejszenie ilości unieruchamianego materiału biologicznego może spowodować zwiększenie efektywności badanego procesu. Wywnioskowałam, że ilość biokatalizatora poddana immobilizacji w II etapie badań była zbyt duża (1 g mokrej biomasy), co mogło wywołać konkurencję cząsteczek substratu o miejsca aktywne enzymu i w konsekwencji spowodować inhibicję reakcji. Innym wytłumaczeniem takiego przebiegu procesu mogła być zbyt mała liczba dostępnych dla glicerolu miejsc aktywnych w immobilizowanym biokatalizatorze. Prawdopodobnie średnica alginianowej kuleczki była zbyt duża (stosowałam igłę o średnicy 1,2 mm), aby umożliwić swobodną wymianę gazową między nośnikiem a środowiskiem zewnętrznym, a także uwalnianie dihydroksyacetonu do środowiska reakcji. Wyniki przeprowadzonych niedawno badań wskazują, że rozmiar alginianowych kuleczek

z biokatalizatorem może mieć duże znaczenie w procesach transportu masy i gazów zachodzących podczas biotransformacji [Orrego i wsp. 2018, Ye i wsp. 2018]. Zmniejszenie średnicy kuleczek unieruchomionego biokatalizatora może ułatwiać dotarcie substratu do centrum aktywnego enzymu i uwolnienie produktu z nośnika do środowiska reakcji, może także usprawniać wymianę gazową podczas biotransformacji [Gutenwik i wsp. 2002]. Zatem w planowaniu kolejnego etapu badań nie rezygnowano z immobilizacji biokatalizatora, lecz zmniejszono ilość immobilizowanego materiału biologicznego w jednostce objętości nośnika, a także otrzymano immobilizat w postaci kuleczek o mniejszej średnicy.

Podsumowując II etap badań stwierdzono, że:

- ⇒ Istnieje możliwość biotechnologicznego utleniania glicerolu odpadowego do DHA z zastosowaniem zarówno wolnych jak i immobilizowanych komórek *G. oxydans* ATCC 621 oraz preparatu komórkowego o aktywności GlyDH, bez konieczności wzbogacania środowiska reakcji o dodatkowe składniki, podtrzymujące żywotność szczepu lub aktywność i stabilność preparatu komórkowego;
- ⇒ Immobilizacja komórek *G. oxydans* miała wpływ na przebieg biotransformacji glicerolu do DHA i wbrew wcześniejszym założeniom, powodowała otrzymanie niższych stężeń produktu w porównaniu z reakcją prowadzoną z zastosowaniem wolnych komórek *G. oxydans* ATCC 621;
- ⇒ Biotransformacja glicerolu odpadowego z zastosowaniem wolnego preparatu komórkowego o aktywności katalitycznej dehydrogenazy glicerolowej, umożliwiła otrzymanie wyższych stężeń DHA w jednostce objętości podłoża produkcyjnego w porównaniu z reakcją prowadzoną z wykorzystaniem immobilizowanego preparatu komórkowego, jakkolwiek najwyższy plon DHA (gg^{-1}) otrzymano w reakcji z zastosowaniem immobilizowanego preparatu komórkowego;
- ⇒ Zastosowanie immobilizacji umożliwiło łatwe oddzielenie biokatalizatora od środowiska reakcji i ułatwiło analizę roztworów poreakcyjnych.

Trzeci etap pracy, opisany w publikacji **H3 Stasiak-Róžańska L., Błażej S., Gientka I., Bzducha-Wróbel A., Lipińska E., 2017, Utilization of a waste glycerol fraction using and reusing immobilized *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 cell extract, Electronic Journal of Biotechnology, 27, 44-48**, zaplanowano na podstawie wyników otrzymanych w etapie drugim. Podjęto decyzję, że w kolejnych badaniach, początkowe stężenie glicerolu odpadowego będzie wynosiło 30 gL^{-1} . Zdecydowano również, że biokatalizatorem reakcji będzie immobilizowany preparat komórkowy otrzymany z *G. oxydans* ATCC 621, immobilizacji zostanie poddana mniejsza ilość materiału biologicznego

w jednostce nośnika niż w etapie II (0,44 g zamiast 1 g na tę samą objętość nośnika) oraz zostanie zastosowana mniejsza średnica igły podczas unieruchamiania preparatu w alginianie sodu (0,9 mm zamiast wcześniejszych 1,2 mm). Dodatkowo, w etapie trzecim sprawdzono czy unieruchomiony preparat komórkowy, wykorzystany podczas jednego procesu biotransformacji glicerolu odpadowego do DHA, zachowa aktywność dehydrogenazy glicerolowej w kolejnej tego typu reakcji. Biotransformację glicerolu do DHA prowadzono w temperaturze 23°C i przy pH 7,5. Parametry te wg danych literaturowych [Mientus i wsp. 2017, Peters i wsp. 2017] zapewniają wysoką aktywność dehydrogenazy glicerolowej. Po zakończeniu biotransformacji, immobilizowany preparat komórkowy oddzielano od mieszaniny poreakcyjnej, przepłukiwano jałową wodą destylowaną i umieszczano w świeżych 3% roztworach glicerolu odpadowego celem przeprowadzenia kolejnego procesu biotransformacji substratu do DHA.

Jak przedstawiono w publikacji H3, po 24 godzinach biotransformacji stężenie glicerolu odpadowego w środowisku reakcji wynosiło 22 gL⁻¹ (o 3 gL⁻¹ mniej niż w etapie II w analogicznych warunkach reakcji). W tym samym czasie zawartość DHA wynosiła około 7 gL⁻¹ (ok. 3 razy więcej niż w etapie II w analogicznych warunkach reakcji), a wydajność biotransformacji w tym czasie osiągnęła wartość 90%. Po 48 godzinach procesu zawartość glicerolu odpadowego zmniejszyła się do 15 gL⁻¹ (w etapie II wartość ta w analogicznych warunkach reakcji wynosiła 22 gL⁻¹), jednocześnie wzrosło stężenie produktu do ok. 9 gL⁻¹ (w etapie II stężenie DHA w analogicznych warunkach reakcji wynosiło 6 gL⁻¹). Zaobserwowano również zmniejszenie wydajności reakcji do 62%. Dalsze prowadzenie biotransformacji powodowało obniżenie stężenia DHA w podłożu reakcyjnym i w związku z tym obniżenie ogólnej wydajności reakcji [H3]. Zmniejszenie stężenia DHA po 72 godzinach reakcji mogło wynikać z dalszych przekształceń tego związku, np. do fosfodihydroksyacetonu [Prust i wsp. 2005, Mamlouk i Gullo 2013]. Inną przyczyną zmniejszenia stężenia DHA w podłożu mogła być zmiana kwasowości czynnej środowiska reakcji. Początkowe pH mieszaniny reakcyjnej było optymalne dla działania GlyDH i wynosiło 7,5, pod koniec procesu wartość ta wynosiła 4,0. W żywych komórkach bakterii octowych wraz z wytwarzaniem DHA może powstawać aldehyd glicerynowy, który następnie ulega przekształceniu do kwasu glicerynowego. Obecność tego kwasu wpływa na obniżenie kwasowości czynnej środowiska [Habe i wsp. 2009]. Prawdopodobnie w zastosowanym preparacie komórkowym obecne były enzymy, umożliwiające wytworzenie kwasu glicerynowego i tym samym obniżenie pH środowiska, co mogło mieć negatywny wpływ na aktywność GlyDH i możliwość dalszego utleniania glicerolu [H3].

Po zakończeniu pierwszej biotransformacji oddzielono immobilizowany preparat komórkowy od środowiska reakcji, przemyto preparat wodą destylowaną i umieszczono w świeżych roztworach glicerolu odpadowego o stężeniu 30 gL^{-1} . Stężenie glicerolu zużytego w trakcie 24 godzin drugiej utylizacji (z powtórnie wykorzystanym preparatem komórkowym) wynosiło 19 gL^{-1} i było o ok. 3 gL^{-1} niższe niż w pierwszej utylizacji. W tym samym czasie średnie stężenie DHA wynosiło ok. 9 gL^{-1} i była to wartość ok. 2 gL^{-1} wyższa w porównaniu do tej, którą otrzymano w pierwszym procesie utylizacji. Jak wykazano w publikacji H3, wydajność utylizacji po 24 godzinach osiągnęła wartość 85% (o 5% mniej niż w pierwszej biotransformacji). Otrzymane wyniki mogły być uwarunkowane przeniesieniem preparatu komórkowego z pH 4,0 do pH 7,5, które jest optymalne dla GlyDH, katalizującej proces przemiany glicerolu do DHA. Dalsze prowadzenie reakcji z powtórnie zastosowanym immobilizowanym preparatem nadal umożliwiało otrzymywanie DHA (stężenie DHA zwiększało się do 96 godziny procesu) [H3]. W reakcji z powtórnie zastosowanym preparatem komórkowym nie zaobserwowano dalszych przekształceń glicerolu (w przeciwieństwie do pierwszej biotransformacji). Stężenie tego substratu po 24 godzinach wynosiło ok. 19 gL^{-1} i utrzymywało się na tym poziomie do końca trwania doświadczenia. Niewielkie zmiany stężenia DHA w kolejnych godzinach drugiej biotransformacji (ok. $6,6 \text{ gL}^{-1}$) wpłynęły na zmniejszenie wydajności reakcji [H3]. Stężenie DHA, otrzymane podczas drugiego cyklu utylizacji, mogło być uwarunkowane zmieniającą się zawartością PQQ w środowisku reakcji. Prawdopodobnie, podczas pierwszego procesu stężenie PQQ (pochodzącego z komórek *G. oxydans*) było wystarczające, aby zapewnić wysoką aktywność GlyDH w immobilizowanym preparacie komórkowym. Podczas drugiej biotransformacji (prowadzonej z użyciem tego samego immobilizowanego preparatu) zawartość PQQ mogła być niewystarczająca do zapewnienia prawidłowego funkcjonowania enzymu.

Podsumowując III etap badań stwierdzono, że:

- ⇒ Zmniejszenie ilości immobilizowanego materiału biologicznego oraz zmniejszenie średnicy kuleczek immobilizatu było dobrą decyzją, ponieważ umożliwiło otrzymanie wyższych stężeń DHA w porównaniu ze stężeniami otrzymanymi w poprzednim etapie badań;
- ⇒ Istnieje możliwość ponownego wykorzystania immobilizowanego preparatu komórkowego w biotransformacji glicerolu odpadowego do DHA, jakkolwiek preparat ten działa skutecznie podczas pierwszej doby procesu, a po tym czasie aktywność GlyDH wyraźnie się zmniejsza.

Te obserwacje skłoniły mnie do zaplanowania kolejnego etapu badań, w którym chciałam sprawdzić czy zastosowanie dodatku PQQ podczas przygotowywania preparatu komórkowego może mieć pozytywny wpływ na przedłużenie trwałości tego biokatalizatora i przedłużenie okresu aktywności obecnego w nim enzymu – dehydrogenazy glicerolowej.

Czwarty etap pracy, szczegółowo opisano w artykule **H4 Stasiak-Róžańska L., Bzducha-Wróbel A., Berthold-Pluta A., 2018, Effect of the additive of pyrroloquinoline quinone on waste glycerol bioconversion to dihydroxyacetone, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 594, 59-67**. Podczas tych badań przeprowadzono ocenę wpływu wybranych stężeń PQQ na przebieg biotransformacji glicerolu odpadowego do DHA z zastosowaniem immobilizowanego preparatu o aktywności GlyDH, pozyskanego z komórek bakterii octowych *G. oxydans* ATCC 621. Otrzymanie preparatu komórkowego przeprowadzono jak we wcześniejszych etapach badań, z tą różnicą, że wszystkie etapy przygotowania, przechowywania i przemywania preparatu komórkowego prowadzono nie w jałowej wodzie, lecz w środowisku buforu o pH 9,0, ponieważ takie pH miało zapewnić zachowanie stabilności GlyDH podczas przebywania preparatu poza środowiskiem biotransformacji (którego pH wynosiło 7,5 i miało zapewnić wysoką aktywność enzymu obecnego w preparacie). Zanim unieruchomiono preparat komórkowy w nośniku, poddano go inkubacji w roztworach PQQ o stężeniach 1, 3, 10 lub 15 μM . Dodatkowo do środowiska reakcji (które zawierało 3% odpadowy glicerol) wprowadzono mieszaninę PQQ (o stężeniu 0,02 ML^{-1}) a także mieszaninę jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} (o stężeniu 0,16 ML^{-1}). Według danych literaturowych dodatek tych jonów mógł mieć pozytywny wpływ na rekonstrukcję GlyDH oraz podtrzymanie aktywności tego enzymu [Lapenaite i wsp. 2005, Sainz i wsp. 2016].

Po upływie pierwszej doby biotransformacji stężenie glicerolu w próbie referencyjnej (przebiegającej z zastosowaniem preparatu, który poddano preinkubacji w roztworze bez dodatku PQQ) wynosiło ok. 16 gL^{-1} . Najniższe stężenie substratu (13 gL^{-1}) oznaczono w tym samym czasie w podłożu, w którym prowadzona była biotransformacja z zastosowaniem preparatu inkubowanego w 3 μM roztworze PQQ. Nieco wyższe stężenie substratu, wynoszące ok. 15 gL^{-1} , odnotowano w podłożach, w których obecny był immobilizowany preparat komórkowy, inkubowany uprzednio w roztworze PQQ o stężeniu 1 μM . Najmniejszy stopień wykorzystania glicerolu oznaczony został w podłożach z preparatem preinkubowanym w roztworach PQQ o stężeniach 10 i 15 μM (odpowiednio 17 i 16,0 gL^{-1}) [H4].

W kolejnej dobie procesu (48 godzina) stężenie glicerolu zmniejszyło się we wszystkich analizowanych wariantach dowiadczenia. Największe zużycie tego związku

(w porównaniu z pomiarem po 24 godzinach) zaobserwowano w podłożu z preparatem preinkubowanym w roztworze PQQ o stężeniu 10 μM i wynosiło ono około 5 gL^{-1} (17 gL^{-1} w 24 godzinie, 12 gL^{-1} w 48 godzinie). W podłożu z preparatem preinkubowanym w roztworze o najwyższym zastosowanym stężeniu PQQ (15 μM) różnica stężeń glicerolu oznaczona w 24 i 48 godzinie wynosiła ok. 3 gL^{-1} . W tym samym czasie stężenie substratu w podłożu referencyjnym (0 μM PQQ) zmniejszyło się o 1,6 gL^{-1} . W pozostałych wariantach doświadczenia (1 i 3 μM PQQ) również zaobserwowano zmniejszenie stężenia glicerolu, w porównaniu do pierwszej doby, jednak nie przekraczało ono 1 gL^{-1} . Przedłużenie czasu biotransformacji do 72 godzin nie spowodowało istotnych różnic w stężeniu glicerolu w podłożu referencyjnym [H4]. W podłożu z preparatem preinkubowanym w roztworze z 3 μM PQQ stężenie glicerolu zmniejszyło się o ok. 1 gL^{-1} (z ok. 13 gL^{-1} w 48 godzinie do ok. 12 gL^{-1} w 72 godzinie).

Jak wykazano w publikacji H4, we wszystkich podłożach, niezależnie od stężenia PQQ w roztworach do preinkubacji, stężenie DHA otrzymane po 24 godzinach reakcji wynosiło średnio 9,3 gL^{-1} . Zawartość oczekiwanego produktu nie uległa zmianie do końca prowadzenia procesu. Odnotowane różnice pomiędzy stężeniami DHA w poszczególnych wariantach doświadczenia, zróżnicowanych ze względu na stężenie kofaktora nie były istotne statystycznie [H4].

Po zakończeniu pierwszej biotransformacji (po 72 godzinach), immobilizowany preparat komórkowy przemyto buforem o pH 9,0, umieszczono w świeżych roztworach glicerolu odpadowego o stężeniu 30 gL^{-1} i prowadzono drugą biotransformację. Po 24 godzinach biotransformacji z powtórnie zastosowanymi preparatami komórkowymi, stężenie glicerolu w podłożu referencyjnym (0 μM PQQ) wynosiło ok. 16 gL^{-1} . W tym samym czasie w pozostałych wariantach podłoży, stężenie substratu było wyższe i wynosiło średnio 17, 19, 16 i 17 gL^{-1} , w podłożach z preparatem poddanym preinkubacji w roztworach PQQ o stężeniach odpowiednio 1, 3, 10 i 15 μM .

Po upływie kolejnej doby stężenie substratu w podłożu kontrolnym uległo zmniejszeniu o ok. 1 gL^{-1} w porównaniu do stężenia oznaczonego w 24 godzinie reakcji. Podobną sytuację zaobserwowano w podłożu, w którym zastosowano preparat preinkubowany w roztworze PQQ o stężeniu 1 μM , jednak w tym przypadku odnotowano zmniejszenie stężenia glicerolu o około 0,5 gL^{-1} . W pozostałych wariantach doświadczenia, stężenie glicerolu po 48 godzinach reakcji ulegało obniżeniu o wartości około 3 gL^{-1} w wariacie 3 μM PQQ oraz o około 0,6 gL^{-1} w wariacie 10 μM PQQ, a także o około 2 gL^{-1} dla stężenia 15 μM PQQ. Po 72 godzinach biotransformacji z powtórnie zastosowanymi preparatami

komórkowymi, nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia glicerolu w porównaniu z oznaczeniami wykonanymi po 48 godzinach biotransformacji. Ostatecznie, w podłożu referencyjnym stężenie glicerolu odpadowego zmniejszyło się o około 15 gL^{-1} , podobnie jak w podłożach, w których prowadzona była biotransformacja z zastosowaniem preparatów inkubowanych w roztworach PQQ o stężeniach 10 i $15 \mu\text{M}$. W pozostałych podłożach stężenie końcowe glicerolu było mniejsze o około 13-14 gL^{-1} od stężenia początkowego (30 gL^{-1}) [H4].

W publikacji H4 wykazano, że stężenie DHA oznaczone po 24 godzinach reakcji (w podłożach, w których prowadzono biotransformację z powtórnie zastosowanymi poszczególnymi biokatalizatorami) wynosiło średnio $9,3 \text{ gL}^{-1}$ (bez względu na zastosowane w preinkubacji stężenia PQQ). Zawartość produktu pozostawała bez zmian aż do zakończenia reakcji (72 godziny) [H4].

Sainz i in. [2016] wykazali, że GlyDH wyizolowana z *G. oxydans* 621H i poddana preinkubacji w roztworze zawierającym 3 mM CaCl_2 i $0,1 \mu\text{M}$ PQQ, wykazywała najwyższą aktywność po 24 godzinach. Zaobserwali również, że aktywność enzymu ulegała obniżeniu po 48 i 96 godzinach. Można zatem przypuszczać, że podobna sytuacja miała miejsce w moich badaniach, z których wynika, że największe zużycie glicerolu (zarówno w pierwszej jak i w drugiej biotransformacji) zachodziło w trakcie pierwszej doby procesu [H4]. PQQ może stanowić kofaktor również dla wielu kinaz, oksydaz, hydratyz oraz dekarboksylaz, w związku z czym część tego kofaktora, przeznaczona dla GlyDH, mogła zostać przyłączona przez inne enzymy, obecne w preparacie komórkowym [Richter i wsp. 2010, Almeida i wsp. 2012, Kumar i wsp. 2015, Yakushi i wsp. 2018].

W etapie trzecim przeprowadzono badania z zastosowaniem preparatu komórkowego z *G. oxydans* ATCC 621, którego nie poddawano preinkubacji z PQQ [H3]. Najwyższe uzyskane wówczas stężenie DHA wynosiło około 9 gL^{-1} (po 48 godzinach). Dalsze prowadzenie biotransformacji powodowało wtedy zmniejszenie zawartości tego związku w podłożu produkcyjnym [H3]. W drugiej biotransformacji etapu III, prowadzonej z powtórным wykorzystaniem preparatu komórkowego, najwyższe stężenie DHA otrzymano po pierwszej dobie reakcji i również wynosiło ono ok. 9 gL^{-1} [H3]. W badaniach przeprowadzonych w czwartym etapie, opisanych w publikacji H4, stężenie DHA otrzymane po 24 godzinach reakcji wynosiło $9,3 \text{ gL}^{-1}$ i nie zmieniało się w kolejnych dobach procesu. Utrzymywanie się zawartości DHA na stałym poziomie mogło być związane ze stabilizowaniem środowiska reakcyjnego buforem (czego nie stosowano w poprzednich etapach badań) [H4].

Jak opisano w publikacji H4, wydajność biotransformacji przebiegającej z zastosowaniem biokatalizatora, który inkubowano w roztworze referencyjnym, bez dodatku PQQ, wynosiła około 30% po 24 godzinach. W miarę upływu czasu reakcji wydajność zwiększała się i wynosiła ok. 58% po 48 i 72 godzinach. Preinkubacja preparatu komórkowego w roztworze PQQ o stężeniu 1 μM umożliwiła przeprowadzenie reakcji z około 60% wydajnością w ciągu 24 godzin pierwszej biotransformacji. W kolejnych punktach pomiarowych (48 i 72 godziny), wydajność wynosiła od 57 do 65%. Wydajność reakcji w podłożu, w którym do preinkubacji preparatu zastosowano dodatek 3 μM PQQ utrzymywała się na poziomie 50-56%. Najwyższe wydajności pierwszej biotransformacji otrzymano po 24 godzinach w podłożach, w których zastosowano preparat inkubowany w roztworach PQQ o stężeniach 10 i 15 μM i wynosiły one odpowiednio 70,5 oraz 66,5%. Po upływie 48 godzin w obu przypadkach nastąpiło zmniejszenie wydajności do około 51-55%, a przedłużenie czasu procesu nie wpływało na zmianę tych wartości [H4].

Podczas biotransformacji prowadzonej z powtórnie zastosowanymi immobilizowanymi biokatalizatorami, obserwowano wyższą wydajność w poszczególnych podłożach w porównaniu do wydajności z pierwszej biotransformacji. W podłożu referencyjnym (0 μM PQQ) wydajność drugiej reakcji po 24 godzinach wynosiła średnio 65,5%, a po kolejnej dobie wzrosła do ok. 85%. Prowadzenie reakcji przez kolejną dobę skutkowało obniżeniem wydajności do ok. 64% [H4].

Jak wykazano w publikacji H4, druga biotransformacja, prowadzona z zastosowaniem preparatu komórkowego, poddanego preinkubacji w roztworze PQQ o stężeniu 1 μM , umożliwiła uzyskanie wydajności około 73, 78 i 69% odpowiednio po 24, 48 i 72 godzinach. Wydajności drugiej biotransformacji w podłożach z preparatem inkubowanym w 3 μM roztworze PQQ były wysokie i wynosiły około 82, 66 i 87%, odpowiednio po 24, 48 i 72 godzinach reakcji.

Podsumowując IV etap badań stwierdzono, że:

- ⇒ Niezależnie od stężenia PQQ zastosowanego do preinkubacji, preparat komórkowy wykazywał aktywność dehydrogenazy glicerolowej zarówno w pierwszej, jak i w drugiej biotransformacji;
- ⇒ Zastosowanie zróżnicowanych stężeń PQQ w etapie preinkubacji preparatu komórkowego o aktywności GlyDH nie miało statystycznie istotnego wpływu na otrzymane stężenia DHA;
- ⇒ W trakcie pierwszej doby procesu, preparat komórkowy z *G. oxydans* charakteryzował się najwyższą aktywnością katalityczną GlyDH;

⇒ Zastosowanie buforu o pH 9,0 podczas przygotowywania, przemywania i przechowywania preparatu komórkowego oraz buforu o pH 7,5 podczas prowadzenia biotransformacji, mogło mieć pozytywny wpływ na stabilizację i aktywność preparatu komórkowego.

Piąty etap pracy, opisany w publikacji **H5 Stasiak-Róžańska L., Płoska J., 2018, Study on the use of microbial cellulose as a biocarrier for 1,3-dihydroxy-2-propanone and its potential application in industry, Polymers, 10, 438**, różnił się nieco od poprzednich. Tym razem nie prowadzono już badań nad metodą biotechnologicznego utleniania glicerolu odpadowego do DHA, lecz podjęto próbę opracowania nowej koncepcji zastosowania DHA w połączeniu z CB. Nieograniczona możliwość wytwarzania celulozy bakteryjnej przez bakterie octowe, wyjątkowo praktyczne cechy tego biopolimeru, a także doświadczenie w prowadzeniu skutecznej biotransformacji glicerolu do DHA, skłoniły mnie do poszukiwania kierunku aplikacji, w której te dwa, w mojej ocenie niezwykle ważne metabolity bakterii octowych, mogłyby zostać połączone, a ich niezwykle właściwości wykorzystane. Tak powstał pomysł otrzymania płyt celulozy bakteryjnej nasączonych roztworami dihydroksyacetonu i sprawdzenia, czy taki bioprodukt mógłby w przyszłości znaleźć praktyczne zastosowanie.

W ostatnim etapie prac, opisanych w publikacji H5, zmierzających do osiągnięcia postawionego celu naukowego, wykorzystano bakterie octowe z gatunku *Gluconacetobacter xylinus*, które cechują się zdolnością do wytwarzania celulozy bakteryjnej (CB). Przeprowadzono serię hodowli tych bakterii w podłożach, umożliwiających wytwarzanie CB. Następnie oczyszczono otrzymane płyty CB z komórek bakteryjnych i nasączono je roztworami czystego chemicznie DHA (o stężeniach 20, 50, 80 lub 110 gL⁻¹). W dalszej kolejności osuszono płyty i aplikowano na skórę w trzech niezależnych powtórzeniach. Czas aplikacji wynosił 15, 30 lub 60 minut. Efekt pigmentacji skóry pod wpływem aplikacji płyt CB nasączonych DHA oceniany był przez niezależnych respondentów w skali od 0 do 5, gdzie 0 oznaczało brak zabarwienia, a 5 najciemniejszy otrzymany kolor skóry. Wszystkie noty odnosiły się do próbki referencyjnej CB, która była inkubowana w wodzie. Stopień brązowienia skóry pod wpływem aplikacji CB z DHA uzależniony był zarówno od stężenia DHA zastosowanego w roztworze, jak również od czasu aplikacji bioproduktu na skórę [H5].

Jak wykazano w publikacji H5, bioprodukt nasączony **2% roztworem DHA** nie wywołał zmian zabarwienia skóry po 15 minutach aplikacji. Wydłużenie czasu aplikacji do 30 minut spowodowało delikatne przyciemnienie skóry (1 punkt w skali 0-5), zaś aplikacja trwająca 60 minut umożliwiła uzyskanie koloru skóry ocenionego na 2 punkty w skali 0-5.

Płaty CB nasączone **5% roztworem DHA** również nie spowodowały wyraźnej pigmentacji skóry po 15 minutach aplikacji, ale wydłużenie czasu kontaktu tego bioproduktu ze skórą, skutkowało zabarwieniem ocenionym przez respondentów na 4 w skali 0-5. Aplikacja płatów przez kolejne 30 minut nie spowodowała przyciemnienia skóry.

Aplikacja celulozy nasączonej **8% roztworem DHA**, trwająca 15 minut, umożliwiła przyciemnienie skóry ocenione przez respondentów na 1 punkt skali. Po 30 minutach aplikacji kolor skóry oceniono na 4 punkty, a po 60 minutach średnia ocena wynosiła 5 punktów w skali 0-5.

Według badań opisanych w publikacji H5, celuloza bakteryjna nasączona **10% roztworem DHA** umożliwiła otrzymanie koloru skóry ocenionego po 15 minutach aplikacji na 1 punkt, natomiast kolor skóry otrzymany zarówno po 30 i 60 minutach aplikacji bioproduktu otrzymał najwyższą możliwą punktację.

Jak wynika z badań opisanych w publikacji H5, czas aplikacji celulozy nasączonej DHA miał większy wpływ na uzyskany kolor skóry niż stężenie DHA zastosowane do nasączenia płatów CB. Kolor skóry oceniony został na 4 punkty po aplikacji CB nasączonej zarówno 5% roztworem DHA (po 30 i 60 minutach), jak również 8 % roztworem DHA (po 30 minutach). Respondenci, biorący udział w badaniu, zgodnie stwierdzili, że 4 punkty (w skali 0-5) odpowiadają takiemu kolorowi skóry, który jest najładniejszy, najbardziej oczekiwany i najbardziej zbliżony do koloru naturalnej opalenizny. Dodatkowo, zwrócono szczególną uwagę na wygodną formę stosowania zaproponowanego bioproduktu oraz na fakt, że zabarwienie skóry uzyskane po jego zastosowaniu nie pozostawiało na skórze charakterystycznego, nieprzyjemnego zapachu, który zawsze towarzyszy stosowaniu komercyjnie dostępnych kosmetyków samoopalających. Uzyskany efekt kolorystyczny utrzymywał się na skórze od 7 do 14 dni [H5].

Podsumowując V etap badań stwierdzono, że:

- ⇒ Celuloza bakteryjna może być skutecznym nośnikiem dihydroksyacetonu;
- ⇒ Płaty CB nasączone DHA mogą stanowić nowy bioprodukt, który umożliwi pigmentację skóry, nie pozostawiając nieprzyjemnego zapachu, typowego dla komercyjnie dostępnych preparatów samoopalających, a jego aplikacja jest łatwa i wygodna dla odbiorcy.

Zaproponowane rozwiązanie, polegające na połączeniu właściwości metabolitów bakterii octowych - CB i DHA ma duże znaczenie praktyczne i może w przyszłości przyczynić się do zaprojektowania bioproduktu, który mógłby znaleźć zastosowanie w opracowaniu metod łagodzenia skutków bielactwa skóry. CB jest biomateriałem, z którego można formować dowolne kształty. Istnieje zatem możliwość zaprojektowania płatów CB,

które mogą dokładnie pasować do miejsc na skórze, których kolor zmienił się w wyniku choroby vitiligo. Struktura CB umożliwia dokładne przywieranie bez względu na kształt i powierzchnię, na którą jest nakładana. Proponowana metoda wymaga dopracowania, ale stwarza możliwość indywidualnego i spersonalizowanego zaprojektowania bioproduktu, który w przyszłości mógłby umożliwić maskowanie efektów bielactwa skóry [H5].

4.3.4. Podsumowanie otrzymanych wyników i omówienie ich ewentualnego wykorzystania

Obserwowany w ostatnich latach dynamiczny wzrost zapotrzebowania na energię i zmieniająca się gospodarka rynkowa, wymusiły poszukiwania alternatywnych źródeł energii. Biopaliwa odnawialne, do których należy biodiesel, miały być odpowiedzią na wyczerpujące się zasoby paliw kopalnych. Niestety, zwiększona produkcja biodiesla wygenerowała kolejny, uciążliwy problem środowiskowy, a mianowicie glicerol odpadowy. Z jednej strony produkcja biodiesla była alternatywą dla ratowania gospodarki paliwowej, ale z drugiej strony w znacznym stopniu przyczyniła się do obciążenia środowiska naturalnego odpadem poprodukcyjnym. Taka sytuacja ekologiczna przyciągnęła uwagę naukowców, którzy podjęli badania nad poszukiwaniem skutecznych sposobów utylizacji glicerolu odpadowego. Ja również zainteresowałam się tym tematem. Od roku 2007 zajmowałam się badaniami, wykorzystującymi wybrane gatunki bakterii octowych do utleniania glicerolu do dihydroksyacetonu. Znane były wówczas wszelkie zalety dihydroksyacetonu jako aktywnego składnika tzw. kosmetyków „samoopalających“, jednak dostępna wówczas literatura naukowa wskazywała na zupełnie nowe i wciąż poszerzające się zastosowania tego związku, m.in. w przemyśle spożywczym. Pracując wówczas z bakteriami octowymi, wiedziałam, że mikroorganizmy te, niczym mikroskopijne bioreaktory, mogą w sposób wydajny prowadzić utlenianie glicerolu do DHA. Połączyłam te informacje i podjęłam badania nad opracowaniem metody, w której bakterie octowe mogłyby wytwarzać dihydroksyaceton, jednak nie z czystego glicerolu, lecz z glicerolu odpadowego, otrzymywanego podczas procesu produkcji biodiesla. Z danych literaturowych wynikało, że DHA może być produkowany metodami chemicznymi, jednak ze względu na trudne warunki reakcji oraz przede wszystkim powstawanie związków ubocznych, zagrażających środowisku naturalnemu, metody te zostały wyparte przez procesy biotechnologiczne, przebiegające z zastosowaniem bakterii octowych. Jednak i te sposoby mikrobiologicznego otrzymywania DHA nie były pozbawione wad. Do głównych

problemów technologicznych otrzymywania DHA metodą mikrobiologiczną należą: długotrwały proces przygotowywania komórek bakterii octowych (obejmujący m.in. namnażanie wstępne, namnażanie właściwe, aktywację enzymu w komórkach), prowadzenie reakcji w podłożach bogatych w związki odżywcze, które są konieczne dla zachowania odpowiedniej aktywności metabolicznej bakterii, a które jednocześnie utrudniają późniejsze oczyszczenie produktu końcowego. Otrzymywanie DHA z zastosowaniem żywych komórek bakterii octowych wymaga zachowania parametrów optymalnych dla ich rozwoju, a nie są to parametry, które byłyby optymalne dla działania dehydrogenazy glicerolowej – enzymu błonowego, katalizującego utlenianie glicerolu do DHA. W wielu patentach pojawiła się również informacja o problemach z odzyskiwaniem DHA z mieszaniny poreakcyjnej. Otrzymanie dobrej jakości finalnego produktu związane jest z kilkuetapowym procesem, obejmującym wirowanie/ewaporację/destylację/zagęszczanie/oczyszczanie. W oparciu o te informacje, zaplanowałam badania, których celem była ocena możliwości opracowania biotechnologicznej metody otrzymywania DHA z glicerolu odpadowego. Nowatorski element założenia badawczego polegał na tym, że stosowane do tej pory podłoże reakcyjne, bogate w składniki odżywcze i wzrostowe, zastąpiłam roztworami glicerolu odpadowego, który pochodził z przemysłowych zakładów produkcji biodiesla, a żywe komórki bakterii octowych, zastąpiłam pozyskanym z ich biomasy preparatem komórkowym, który wykazywał aktywność katalityczną dehydrogenazy glicerolowej. Dodatkowo, wprowadziłam immobilizację biokatalizatora w celu ułatwienia oddzielenia go od środowiska reakcji. Proces biotransformacji glicerolu odpadowego do DHA prowadziłam w warunkach optymalnych dla dehydrogenazy glicerolowej, nie zaś (jak to było wcześniej praktykowane) optymalnych dla wzrostu i aktywności metabolicznej bakterii octowych.

W moim odczuciu wyniki badań przeprowadzonych przeze mnie i Współpracowników, mają duże znaczenie praktyczne i wnoszą wkład w rozwój dziedziny nauk rolniczych, albowiem na ich podstawie:

Wykazano możliwość przeprowadzenia skutecznej biotransformacji glicerolu odpadowego do dihydroksyacetonu z zastosowaniem biokatalizatora w postaci immobilizowanego preparatu komórkowego o aktywności katalitycznej dehydrogenazy glicerolowej.

W mojej opinii dodatkowym atutem opracowanej metody jest możliwość zastosowania immobilizacji oraz wykorzystania unieruchomionego biokatalizatora w powtórnym procesie, co ma pozytywny wpływ zarówno na skrócenie czasu reakcji, jak również na kosztocłonność i pracocłonność całego procesu.

Obecnie w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności WNoŻ SGGW w Warszawie prowadzę badania nad zastosowaniem tej metody w skali bioreaktora. Podjęłam już próby wytrącenia DHA ze środowiska reakcji, po uprzednim zagęszczeniu mieszaniny poreakcyjnej. Zdecydowana większość badań opublikowanych w renomowanych czasopiśmie naukowych kończy się oznaczeniem stężenia DHA w roztworach poreakcyjnych. Do tej pory w nielicznych publikacjach opisano próby wytrącenia DHA ze środowiska reakcji. Nie jest to proste zadanie, ale prace, które podjęłam w tym zakresie, zdają się być obietnicą na uzyskanie w niedalekiej przyszłości interesujących wyników, a także nawiązanie współpracy z otoczeniem przemysłowym.

W cyklu publikacji naukowych, które weszły w skład mojego osiągnięcia naukowego, ujęłam również pracę, która w sposób bezpośredni wiąże się z głównym wątkiem tematycznym, jednakże odbiega nieco koncepcją badań. W ostatnich kilku latach nastąpił znaczny wzrost zapotrzebowania na DHA w sektorze przemysłu kosmetycznego. Rynek preparatów samoopalających odnotował rekordowe przyrosty zysków. W tym samym czasie moje zainteresowania naukowe skierowałam na inny metabolit bakterii octowych – celulozę bakteryjną. Szczególne właściwości tego biopolimeru, wysoka odporność na czynniki mechaniczne, nieprzeciętna uniwersalność aplikacji i w zasadzie nieograniczona możliwość produkcji, skłoniły mnie do poszukiwania sposobu połączenia CB i DHA. I tak powstał pomysł opracowania nowego bioproduktu, czyli płatów celulozy bakteryjnej nasączonych dihydroksyacetonem. Przeprowadzone badania wskazały nową możliwość połączenia CB i DHA, co może być znaczącym osiągnięciem, albowiem

Otrzymano bioprodukt, łączący właściwości dihydroksyacetonu i celulozy bakteryjnej, który może być wykorzystany do miejscowej zmiany koloru skóry.

Taki bioprodukt może powodować oczekiwaną i odwracalną zmianę koloru skóry, w sposób, który nie pozostawia nieprzyjemnego zapachu (typowego dla obecnych na rynku produktów samoopalających). Poza tym, taki bioprodukt mógłby zostać wzbogacony o inne aktywne składniki, które pozytywnie oddziałują na skórę podczas aplikacji. Zainteresowanie środowiska przemysłowego takim rozwiązaniem dodało mi pewności, że koncepcja podjętych badań była słuszna i zachęciło do kontynuowania tych prac w najbliższej przyszłości.

4.4. Spis literatury

1. **Ahmadi** J, Joukar S, Anani H, Karami-Mohajeri S, Dihydroxyacetone as a definitive treatment for aluminium phosphide poisoning in rats, *Arh Hig Rada Toksikol*, 2018, 69, 169-177
2. **Almeida** JRM, Fávoro LCL, Quirino BF, Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste, *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5, 48-64
3. **Anand** P, Saxena RK, A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*, *New Biotechnol*, 2012, 29, 199–205
4. **Attchelouwa** CK, N'guessan FK, Aké FMD, Djè MK, Molecular identification of yeast, lactic and acetic acid bacteria species during spoilage of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire, *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 9, 34 (11), 173
5. **Bakula** Z, Stachowiak R, Wiśniewski J, Granicka L, Bielecki J, Immobilizacja komórek - znaczenie biomedyczne, *Post Mikrob*, 2013, 52 (3), 233-245
6. **Bala-Litwiniak** A, Radomiak H, Possibility of the utilization of waste glycerol as an addition to wood pellets, *Waste Biomass Valor*, 2018, 9, 1-7
7. **Bianchi** CL, Canton P, Dimitratos N, Porta F, Prati L, Selective oxidation of glycerol with oxygen using mono and bimetallic catalysts based on Au, Pd and Pt metals, *Catal Today*, 2005, 102, 203–212
8. **Binhayeeding** N, Klomklao S, Sangkharak K, Utilization of Waste Glycerol from Biodiesel Process as a Substrate for Mono-, Di-, and Triacylglycerol Production, *Energy Procedia*, 2017, 138, 895-900
9. **Black** CS, Nair GR, Bioconversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized *Gluconacetobacter xylinus* cells, *Int J Chem Eng Appl*, 2013, 4 (5), 310-314
10. **Błażej** S, Stasiak-Róžańska L, Markowski K, Lipińska E, Zwiększenie zdolności biosyntezy dihydroksyacetonu przez bakterie *Gluconacetobacter xylinus* za pomocą mutagenizacji promieniowaniem UV, *Act Sci Pol Biotechnol*, 2011, 10 (2), 17-24
11. **Braunberger** TL, Nahhas AF, Katz LM, Sadrieh N, Lim HW, Dihydroxyacetone: a review, *J Drugs Dermatol*, 2018, 17, 387-391
12. **Chanprateep** S, Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates, *J Biosci Bioeng*, 2010, 110, 621–632
13. **Chatzifragkou** A, Papanikolaou S, Dietz D, Doulgeraki AI, Nychas GJE, Zeng AP, Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91,101–12
14. **Chatzifragkou** A, Papanikolaou S, Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95, 13–27
15. **Ciriminna** R, Fidalgo A, Ilharco LM, Pagliaro M, Dihydroxyacetone: An Updated Insight into an Important Bioproduct, *Chem Open*, 2018, 7, 233-236
16. **Ciriminna** R, Palmisano G, Pina CD, Rossi M, Pagliaro M, One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA, *Tetrahedron Lett*, 2006, 47, 6993–6995
17. **Coelho** E, Genisheva Z, Oliveira JM, Teixeira JA, Domingues L, Vinegar production from fruit concentrates: effect on volatile composition and antioxidant activity, *J Food Sci Technol*, 2017, 54 (12), 4112–4122

18. **Cummings** TF, The treatment of cyanide poisoning, *Occup Med*, 2004, 54, 82-85
19. **Czaja** W, Young DJ, Kawecki M, Brown RM Jr., The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications, *Biomacromolecules*, 2007, 8 (1), 1-12
20. **Dembczyński** R, Jankowski T, Unieruchamianie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania – stan obecny i możliwości rozwoju tej metody, *Żywn Nauk Technol J*, 2004, 4 (41), 5 – 17
21. **Diaz** I, Mohino F, Pérez-Pariente J, Sastre E, Synthesis of MCM-41 materials functionalised with dialkylsilane groups and their catalytic activity in the esterification of glycerol with fatty acids, *App Cat A: Gen*, 2003, 242, 161-169
22. **Dimitratos** N, Francesca P, Prati L, Au, Pd (mono and bimetallic) catalysts supported on graphite using the immobilisation method synthesis and catalytic testing for liquid phase oxidation of glycerol, *Appl Catal A Gen*, 2005, 291, 210–214
23. **Dubin** A, Anioł A, Bielecki S, Borowicz P, Czarnik M, Kur JW, Kuźmierkiewicz W, Pietrucha T, Sławeta R, Świtoński M, Torbicz W, Wieczorek M, Stan i kierunki rozwoju biogospodarki, *MNiSW*, Warszawa, 2007, 100–108
24. **Erni** B, Siebold C, Christen S, Srinivas A, Oberholzer A, Baumann U, Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinases, *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63 (7-8), 890-900
25. **Feng** X, Ullah N, Wang X, Sun X, Li C, Bai Y, Chen L, Li Z, Characterization of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917, *J Food Sci*, 2015, 80, 2217–2227
26. **Gomes** RJ, Borges MF, Rosa MF, Castro-Gómez RJH, Spinosa WA, Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications, *Food Technol Biotechnol*, 2018, 56 (2), 139-151
27. **Gullo** M, La China S, Falcone PM, Giudici P, Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102 (16), 6885-6898
28. **Gutenwik** J, Nilsson B, Axelsson A, Mass transfer effects on the reaction rate for heterogeneously distributed immobilized yeast cells, *Biotechnol Bioeng*, 2002, 79, 664–673
29. **Habe** H, Fuknoka T, Kitamoto D, Sakaki K, Biotransformation of glycerol to D-glyceric acid by *Acetobacter tropicalis*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 81, 1033–1039
30. **Hayyan** A, Mjalli FS, Hasim MA, Hayyan M, Al Nashef M, Conversion of crude glycerol fatty acids in low grade crude palm oil to methyl esters for biodiesel production using chromosulfuric acid, *Bulg Chem Commun*, 2013, 45, 394-399
31. **Henderson** PW, Kadouch D, Singh SP, Zawaneh PN, Weiser J, Yazdi S, Weinstein A, Krotscheck U, Wechsler B, Putnam D, Spector JAJ, A rapidly resorbable hemostatic biomaterial based on dihydroxyacetone, *Biomed Mater Res A*, 2010, 93, 776–782
32. **Hiremath** A, Kannabiran M, Rangaswamy V, 1,3-Propanediol production from crude glycerol from jatropha biodiesel process, *New Biotechnol*, 2011, 28, 19–23
33. **Ito** T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishi N, Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process, *J Biosci Bioeng*, 2005, 100, 260–265

34. **Kowalska-Ludwicka** K, Cala J, Grobelski B, Sygut D, Jesionek-Kupnicka D, Kolodziejczyk M, Bielecki S, Pasieka Z, Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves, *Arch Med Sci*, 2013, 20 (9), 527–534
35. **Kumar** GS, Wee Y, Lee I, Sun HJ, Zhao X, Xia S, Kim S, Lee J, Wang P, Kim J, Stabilized glycerol dehydrogenase for the conversion of glycerol to dihydroxyacetone, *Chem Eng J*, 2015, 276, 283–288
36. **Kumaravel** V, Gopal SR, Immobilization of *Bacillus amyloliquefaciens* MBL27 cells for 376 enhanced antimicrobial protein production using calciumalginate beads, *Biotechnol Appl Biochem*, 2010, 57, 97-103
37. **Lapenaite** I, Kurtinaitiene B, Razumiene J, Laurianavicius V, Marcinkieviciene L, Bachmatova I, Meskys R, Ramanavicius A, Properties and analytical application of PQQ – dependent glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter* sp., *Anal Chim Acta*, 2005, 549, 140–150
38. **Lee** JM, Kim JH, Lee OJ, Park CH, The fixation effect of a silk fibroin-bacterial cellulose composite plate in segmental defects of the zygomatic arch: an experimental study, *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 139 (6), 629-35
39. **Leoneti** AB, Aragão-Leoneti V, de Oliveira SVWB, Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol, *Renew Energ*, 2012, 45, 138-145
40. **Lin** N, Dufresne A, Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect, *European Polymer Journal*, 2014, 59, 302-325
41. **Mamlouk** D, Gullo M, Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation, *Indian J Microbiol*, 2013, 53 (4), 377–384
42. **Manara** P, Zabaniotou A. Co-valorization of crude glycerol waste streams with conventional and/or renewable fuels for power generation and industrial symbiosis perspectives, *Waste Biomass Valor*, 2016, 7, 135-150
43. **Maravi** DK, Kumar S, Sharma PK, Kobayashi Y, Goud VV, Sakurai N, Koyama H, Sahoo L, Ectopic expression of AtDGAT1, encoding diacylglycerol O-acyltransferase exclusively committed to TAG biosynthesis, enhances oil accumulation in seeds and leaves of *Jatropha*, *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9, 226-239
44. **Mientus** M, Kostner D, Peters B, Liebl W, Ehrenreich A, Characterization of membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans* 621H using a new system for their functional expression, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(8), 3189-3200
45. **Mu** Y, Xiu ZL, Zhang DJ, A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*, *Biochem Eng J*, 2008, 40, 537–541
46. **Niknahad** H, Ghelichkhani E, Antagonism of cyanide poisoning by dihydroxyacetone, *Tox Lett*, 2002, 132, 95-100
47. **Nitayavardhana** S, Khanal SK, Biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: a sustainable option for a biodiesel refinery, *Bioresour Technol*, 2011, 102, 5808-5814
48. **Orrego** D, Zapata-Zapata AD, Kim D, Ethanol production from coffee mucilage fermentation by *S. cerevisiae* immobilized in calcium-alginate beads, *Bioresour Technol Rep*, 2018, 3, 200–204
49. **Papanikolaou** S, Aggelis G, Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*, *Lipid Technol*, 2009, 21, 83–87

50. **Pavlovic-Djuranovic** S, Kun JF, Schultz JE, Beitz E, Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the *Plasmodium aquaglyceroporin* inhibit parasite proliferation, *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758 (8), 1012-1017
51. **Peters** B, Mientus M, Kostner D, Daniel R, Liebl W, Ehrenreich A, Expression of membrane-bound dehydrogenases from a mother of vinegar metagenome in *Gluconobacter oxydans*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101 (21), 7901-7912
52. **Peters** B, Mientus M, Kostner D, Junker A, Liebl W, Ehrenreich A, Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97, 6397–6412
53. **Prust** C, Hoffmeister M, Liesegang H, Wiezer A, Fricke WF, Ehrenreich A, Gottschalk G, Deppenmeier U, Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*, *Nat Biotechnol*, 2005, 23, 195–200
54. **Quispe** CAG, Coronado CJR, Carvalho JA Jr, Glycerol: production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion, *Renew Sust Energy Rev*, 2013, 27, 475-493
55. **Richter** N, Breicha K, Hummel W, Niefind K, The three-dimensional structure of AKR11B4, a glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*, reveals a tryptophan residue as an accelerator of reaction turnover, *J Mol Biol*, 2010, 404, 353–362
56. **Sainz** F, Mas A, Torija MJ, Draft Genome Sequence of *Acetobacter malorum* CECT 7742, a Strain Isolated from Strawberry Vinegar, *Genome Announc*, 2016, 4 (3): e00620-16
57. **Sainz** F, Torija MJ, Matsutani M, Kataoka N, Yakushi T, Matsushita K, Mas A, Determination of dehydrogenase activities involved in D-glucose oxidation in *Gluconobacter* and *Acetobacter* strains, *Front Microbiol*, 2016, 7, 1358-1372
58. **Stasiak** L, Błażej S, Acetic Acid Bacteria – perspectives of application in Biotechnology – a review, *Pol J Food Nutr Sci*, 2009, 59 (1), 17-23
59. **Stasiak-Róžańska** L, Błażej S, Miklaszewska A, Application of immobilized cell preparation obtained from biomass of *Gluconacetobacter xylinus* bacteria in biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2011, 10 (1), 35-49
60. **Stasiak-Róžańska** L, Błażej S, Miklaszewska A, Application of immobilized cell preparation obtained from biomass of *Gluconacetobacter xylinus* bacteria in biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2011, 10 (1), 35-49
61. **Stasiak-Róžańska** L, Badania nad wykorzystaniem wybranych gatunków bakterii octowych do otrzymywania preparatu komórkowego o aktywności katalitycznej dehydrogenazy glicerolowej, rozprawa doktorska, Warszawa, 2012
62. **Stasiak-Róžańska** L, Błażej S, Dihydroksyacetone – charakterystyka, zastosowanie, otrzymywanie, *ACTA Sci Pol Biotechnol*, 2011, 11 (1), 17-28
63. **Stasiak-Róžańska** L, Błażej S, Gientka I, Effect of glycerol and dihydroxyacetone concentrations in the culture medium on the growth of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621, *Eur Food Res Technol*, 2014, 239, 453-461

64. **Stasiak-Róžańska L**, Błażej S, Production of dihydroxyacetone from an aqueous solution of glycerol in the reaction catalyzed by an immobilized cell preparation of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621, *Europ Food Res Technol*, 2012, 235, 1-8
65. **Stasiak-Róžańska L**, Błażej S, Ratz A, Investigations into the optimization of parameters of glycerol biotransformation to dihydroxyacetone with the use of immobilized cells of *Gluconobacter xylinus*, *Pol J Food Nutr Sci*, 2010, 60 (3), 273-280
66. **Uzcátegui NL**, Carmona-Gutiérrez D, Denninger V, Schoenfeld C, Lang F, Figarella K, Duszenko M, Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* bloodstream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death, *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(11), 3960-3968
67. **Valera MJ**, Poehlein A, Torija MJ, Haack FS, Daniel R, Streit WR, Mateo E, Mas A, Draft Genome Sequence of *Komagataeibacter europaeus* CECT 8546, a Cellulose-Producing Strain of Vinegar Elaborated by the Traditional Method, *Genome Announc*, 2015, 3(5): e01231-15
68. **Vasudevan PT**, Fu B, Environmentally sustainable biofuels: advances in biodiesel research, *Waste Biomass Valor*, 2010, 1, 47–63
69. **Wang B**, Shao Y, Chen F, Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria, *World J Microbiol Biotechnol*, 2015, 31 (2), 255-263
70. www.ica.org, dostęp w dniu 05.02.2019 r.
71. **Yakushi T**, Terada Y, Ozaki S, Kataoka N, Akakabe Y, Adachi O, Matsutani M, Matsushita K, Aldopentoses as new substrates for the membrane-bound, pyrroloquinoline quinone-dependent glycerol (polyol) dehydrogenase of *Gluconobacter* sp., *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102, 3159–3171
72. **Yang F**, Hanna MA, Sun R. Value-added uses for crude glycerol - A byproduct of biodiesel production, *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5 (13), 1-10
73. **Ye Z**, Song J, Zhu E, Song X, Chen X, Xiaoting H, Alginate Adsorbent Immobilization Technique Promotes Biobutanol Production by *Clostridium acetobutylicum* Under Extreme Condition of High Concentration of Organic Solvent, *Front Microbiol*, 2018, 9, 1071-1078
74. **Yin XY**, Zhong WK, Huo J, Chang X, Yang ZH, Production of vinegar using edible alcohol as feedstock through high efficient biotransformation by acetic acid bacteria, *Food Sci Biotechnol*, 2017, 27 (2), 519-524

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje zainteresowania naukowe zmieniały się wraz z etapem mojej edukacji, doświadczenia zawodowego oraz pod wpływem środowiska naukowego, z którym miałam zaszczyt współpracować. Jednak wśród ogólnych doświadczeń naukowo-badawczych, które zdobywałam wraz z początkiem mojej edukacji wyższej (tj. od 2001 roku), można wyodrębnić trzy główne kierunki zainteresowań, które dotyczą:

- ⇒ Analizy funkcjonalnej wybranych genów bakterii mlekowych z gatunku *Lactococcus lactis*
- ⇒ Charakterystyki potencjału biochemicznego wybranych gatunków bakterii octowych, ukierunkowanego na utlenianie glicerolu do dihydroksyacetonu
- ⇒ Analizy mikrobiologicznej żywności, ze szczególnym uwzględnieniem występowania pałeczek z rodzaju *Cronobacter*

W 2001 r. podjęłam studia na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii SGGW w Warszawie. Moje zainteresowania naukowe skierowane były w stronę zastosowań nowych technologii w przemyśle spożywczym. W tamtym czasie szczególnie interesowałam się technikami molekularnymi i inżynierią genetyczną. Interesowało mnie **zastosowanie różnych metod modyfikacji genetycznych mikroorganizmów, które następnie mogą być wykorzystywane w przemyśle spożywczym**. W tym zakresie współpracowałam z grupą badawczą prof. Jacka Bardowskiego z Zakładu Biochemii Drobnoustrojów IBB PAN pod opieką naukową dr Tamary Aleksandrak-Piekarczyk, z którą prowadziłam **badania nad analizą funkcji genu *yebF*, występującego w szczepie *Lactococcus lactis* IL1403**. Pierwszym etapem określenia funkcji genu *yebF* było utworzenie mutantu, pozbawionego genu *yebF* (IL1403 $\Delta yebF$) oraz mutantu, pozbawionego równocześnie genów *yebF* i *ccpA* (IL1403 $\Delta ccpA \Delta yebF$). W celu określenia cech fenotypowych otrzymanych mutantów, przeprowadzono szereg testów wzrostowych i biochemicznych. W celu ustalenia poziomu ekspresji genu *yebF* w odpowiedzi na różne źródła węgla, wykonano fuzję promotora tego genu z genami reporterowymi *luxAB*, a następnie wintegrowano je do chromosomu dzikiego szczepu IL1403 oraz jego mutantu *ccpA*. Następnie zbadano ekspresję genu *yebF* w komórkach szczepu IL1403. W ramach badań do pracy magisterskiej skonstruowałam również mutantu zdolnego do nadprodukcji białka CcpA, które następnie wyizolowałam i oczyściłam, a w późniejszych badaniach (nie ujętych w pracy magisterskiej) **brałam udział w sprawdzaniu oddziaływania białka CcpA z wybranymi genami *L. lactis* IL1403**. Wyniki otrzymane w czasie pracy magisterskiej w połączeniu z wynikami dostępnymi

wówczas w literaturze, pozwoliły na **zbudowanie hipotetycznego modelu, który wyjaśnia rolę, jaką mógłby pełnić gen *yebF* w indukowanym celobiozą metabolizmie laktozy u *L. lactis* IL1403**. Według tego modelu celobioza jest transportowana do wnętrza komórki przez permeazę (białko CelB), będącą składnikiem specyficznego dla β -glukozydów systemu PTS. Podczas translokacji celobioza ulega fosforylacji, a prawdopodobnymi przekaźnikami grupy fosforanowej są białka PtcA i PtcB. Jak stwierdzono, białko YebF znajduje się w komórce na stałym poziomie. Ufosforylowana celobioza wiąże się z domeną SIS białka YebF i w ten sposób aktywuje je funkcjonalnie. Taka sytuacja może powodować zmianę konformacji białka tak, że możliwe staje się jego przyłączenie za pośrednictwem domeny HTH do genu *celB*. Powoduje to aktywację ekspresji genu *celB*, wywołując wzmożoną produkcję białka CelB. Sytuacja, w której w błonie cytoplazmatycznej występuje podwyższona ilość permeazy, może umożliwiać wnikanie laktozy do wnętrza komórki. Według tego modelu, przy braku białek YebF i CcpA w komórkach *L. lactis* IL1403 (IL1403 $\Delta ccpA \Delta yebF$), szczep jest zdolny do wykorzystywania celobiozy, najprawdopodobniej dzięki obecności genu *celB*. Gen *celB* posiada w regionie promotorowym sekwencje cre, co sugeruje, że może on ulegać represji katabolicznej przez białko CcpA. Hipotetyczny model, zbudowany w oparciu o wyniki mojej pracy magisterskiej znalazł potwierdzenie w wynikach testów wzrostowych określonych mutantów. W sytuacji, gdy w genomie IL1403 nieobecny jest gen *yebF*, ale funkcjonuje gen *ccpA* (IL1403 $\Delta yebF$), białko CcpA może działać jako represor w stosunku do genu *celB* i wykorzystywanie celobiozy przez szczep może być niemożliwe. Badania te oraz ich wyniki opisałam w pracy magisterskiej pt. „**Analiza funkcjonalna genu *yebF*, kodującego hipotetyczny regulator transkrypcji u *Lactococcus lactis* IL1403**“, której promotorem była dr T. Aleksandrak-Piekarczyk. Pracę magisterską obroniłam z wynikiem bardzo dobrym w 2006 roku. Rezultaty mojej pracy magisterskiej były prezentowane na Sesji Młodej Kadry Naukowej w Łodzi w postaci posteru (zał. 4, III, B, 8), za który otrzymałam nagrodę główną (zał. 4, III, D, 5) oraz podczas wystąpienia na Międzynarodowym Kongresie Bakteriologii i Mikrobiologii Stosowanej w Istambule (zał. 4, III, B, 7). **Po uzyskaniu tytułu zawodowego magistra inżyniera** w zakresie biotechnologii w przemyśle spożywczym, kontynuowałam współpracę z IBB jako wykonawca grantu, w ramach którego prowadziłam dalsze **badania nad analizą funkcjonalną genów regulatorowych, biorących udział w katabolizmie laktozy i glukozydów w komórkach *L. lactis*** (zał. 4, II, I, 6). Moja rola w tym projekcie polegała m.in. na klonowaniu genów, konstruowaniu fuzji transkrypcyjnych genów reporterowych, tworzeniu mutantów delecyjnych, nadprodukcji i oczyszczaniu białek bakteryjnych. Przeprowadzone badania oraz ich

wyniki zostały opisane i opublikowane w 2015 roku w czasopiśmie Applied Microbiology and Biotechnology (zał. 4, II, A, 10).

Współpraca z Naukowcami z ZBD IBB PAN układała się pomyślnie, dawała mi wiele satysfakcji oraz stwarzała możliwość poznawania nowych rozwiązań badawczych w zakresie genetyki drobnoustrojów, jakkolwiek w tamtym czasie planowałam już podjęcie edukacji na studiach III stopnia. **W październiku 2007 roku rozpoczęłam studia doktoranckie** o specjalności technologia żywności, biotechnologia żywności, chemia żywności, inżynieria żywności i ocena żywności przy Wydziale Nauk o Żywności SGGW w Warszawie. Rozpoczęcie studiów na SGGW nie oznaczało jednak zerwania współpracy z IBB. W dalszym ciągu utrzymywałam kontakt z dawną grupą badawczą, co umożliwiałało mi organizowanie staży naukowych studentów SGGW w IBB oraz realizowanie prac inżynierskich i magisterskich studentów SGGW w IBB. Zrealizowałam również dwumiesięczny staż naukowy w IBB, podczas którego poznałam nowe metody globalnej analizy efektów mutacji chromosomalnej u bakterii mlekowych w podejściu proteomicznym i transkryptomycznym (zał. 4, III, L, 1). Jestem również odpowiedzialna za koordynowanie działań, wynikających z porozumienia między WNoŻ SGGW a IBB PAN (zał. 4, III, Q, Działalność organizacyjna, 4).

Moja działalność naukowa podczas studiów doktoranckich skupiała się głównie wokół **bakterii octowych oraz możliwości zastosowania ich potencjału biochemicznego w procesie utleniania glicerolu do dihydroksyacetonu**. W pracy doktorskiej przeprowadziłam badania, które zmierzały do **wyboru odpowiedniego szczepu bakterii octowych, zdolnego do efektywnego utleniania glicerolu technicznego do DHA oraz opracowania metody pozyskiwania preparatu komórkowego z tych mikroorganizmów**.

Badania ujęte w mojej pracy doktorskiej obejmowały m.in. charakterystykę wzrostu wybranych gatunków bakterii octowych (*Acetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconobacter oxydans*) w podłożach modelowych oraz ustalenie optymalnych parametrów hodowli tych drobnoustrojów. Przeprowadziłam serię biotransformacji glicerolu technicznego (obecnego w podłożach mikrobiologicznych) do dihydroksyacetonu z zastosowaniem immobilizowanych komórek *A. xylinum*. Podłoża były zróżnicowane ze względu na początkową zawartość glicerolu (30, 50, 70 lub 100 gL⁻¹) oraz pH (pH 5,0; 7,0; 8,0). Podobne badania przeprowadziłam z zastosowaniem pozostałych gatunków bakterii octowych, jednak w tym przypadku rozbudowałam zakres badawczy i w biotransformacji glicerolu do DHA stosowałam komórki wolne oraz immobilizowane. **Ustaliłam również, w której frakcji preparatu komórkowego obecna jest aktywna dehydrogenaza**

glicerolowa. Zrealizowane badania pozwoliły stwierdzić, że enzym ten obecny jest w resztkach komórkowych i pozostaje związany z błonami komórek zdeintegrowanych ultradźwiękami. Na podstawie przeprowadzonych badań wykluczono obecność aktywnej formy enzymu w osadzie komórkowym jak również w supernatancie. **Badania umożliwiły doprecyzowanie metody otrzymywania preparatu komórkowego o aktywności katalitycznej dehydrogenazy glicerolowej.** Wykazano, że ultradźwiękowa dezintegracja komórek bakterii jest skuteczniejsza w otrzymywaniu preparatu komórkowego, w porównaniu do metody enzymatycznej. Wykazano również możliwość przeprowadzenia biotransformacji glicerolu do DHA w środowisku zawierającym jedynie wodny roztwór glicerolu technicznego i immobilizowany preparat komórkowy jako biokatalizator procesu. Na podstawie tych wyników zaplanowałam dalsze etapy mojej aktywności badawczo-naukowej, które zmierzały w kierunku otrzymywania DHA z glicerolu odpadowego.

Publikacje naukowe oraz doniesienia konferencyjne, dotyczące badań prowadzonych podczas realizowania pracy doktorskiej zostały przedstawione w załączniku 4: Stasiak i wsp. 2008 (zał. 4, III, B, 6); Stasiak i Błażej 2009 (zał. 4, II, D, 20); Stasiak-Róžańska i Błażej 2009 (zał. 4, III, B, 5); Stasiak-Róžańska i wsp. 2010 (zał. 4, II, D, 19); Stasiak-Róžańska i wsp. 2010 (zał. 4, III, B, 1); Stasiak-Róžańska i wsp. 2010 (zał. 4, III, B, 2); Stasiak-Róžańska i wsp. 2011 (zał. 4, II, D, 17); Stasiak-Róžańska i Błażej 2011 (zał. 4, II, K, 3); Stasiak-Róžańska i Błażej 2011 (zał. 4, II, D, 15); Stasiak-Róžańska i Błażej 2012 (zał. 4, II, A, 13).

Podczas realizowania badań do pracy doktorskiej udało mi się pozyskać środki finansowe, które umożliwiły zakupienie aparatury i odczynników, a także zlecenie części badań innym ośrodkom naukowym. Dzięki podjętym staraniom otrzymałam tzw. „Mazowieckie Stypendium Doktoranckie“ (zał. 4, III, D, 4), z którego sfinansowałam część badań do pracy doktorskiej. Byłam również współautorem wniosku oraz głównym wykonawcą grantu promotorskiego, przyznanego decyzją MNiSW (zał. 4, II, I, 5), dzięki któremu możliwe było sfinansowanie znacznej części badań zaplanowanych w pracy doktorskiej. Ze względu na urodzenie dziecka, przedłużyłam studia doktoranckie o 6 miesięcy i **w kwietniu 2012 roku z wyróżnieniem obroniłam pracę doktorską, zatytułowaną „Badania nad wykorzystaniem wybranych gatunków bakterii octowych do otrzymywania preparatu komórkowego o aktywności katalitycznej dehydrogenazy glicerolowej“.**

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, kontynuowałam badania nad biotechnologiczną metodą otrzymywania

dihydroksyacetonu, jednak w tych badaniach zastąpiłam glicerol techniczny odpadową frakcją glicerynową z produkcji biodiesla.

Po uzyskaniu stopnia doktora, moje zainteresowania naukowe, obejmowały także **analizę mikrobiologiczną wybranych surowców i produktów spożywczych, ze szczególnym uwzględnieniem występowania pałeczek z rodzaju *Cronobacter***.

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* należą do rodziny *Enterobacteriaceae* i bytują głównie w jelitach ludzi i zwierząt. Jednym z głównych przedstawicieli tej rodziny jest gatunek *Cronobacter sakazakii*. Bakterie te funkcjonowały do niedawna w literaturze pod nazwą *Enterobacter sakazakii*, jednak badania taksonomiczne i genetyczne wykazały dużą różnorodność w zakresie tych gatunków. Na tej podstawie zaproponowano nową nazwę rodzaju – *Cronobacter*. Bakterie *Cronobacter* izolowano z wielu skupisk środowiskowych, a także z szerokiej gamy produktów żywnościowych, m.in. z kukurydzy, soi, płatków zbożowych, pszenicy, ziół, przypraw, kiełków warzyw oraz sałatek, jednak pierwotne, naturalne źródło występowania tych bakterii pozostaje nieznane. Do niedawna zatrucia wywołane bakteriami z rodzaju *Cronobacter* nie były diagnozowane, gdyż bardzo rzadko bakterie te były przyczyną chorób u ludzi. Odkryto jednak, że zachorowania wywołane przez te drobnoustroje charakteryzowały się wysokim stopniem śmiertelności i dotyczyły głównie noworodków. To wywołało większe zainteresowanie tymi mikroorganizmami wśród lekarzy, higienistów żywności jak również epidemiologów. Choroby wywoływane przez bakterie z rodzaju *Cronobacter* u noworodków to najczęściej zapalenie opon mózgowych, zaburzenia neurologiczne, a także zapalenie jelit i sepsa (Berthold-Pluta i wsp. 2018, zał. 4, II, D, 22). Badania dotyczące występowania pałeczek *Cronobacter* w żywności, które podjęłam wraz z dr inż. Anną Berthold-Plutą i dr inż. Moniką Garbowską (Dolińską) obejmowały początkowo **badania jakości mikrobiologicznej preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci** (Stasiak-Róžańska i wsp. 2009, zał 4., III, B, 4; Stasiak-Róžańska i wsp. 2010; zał. 4, II, D, 18). Przebadano 60 próbek ww. preparatów. W badaniach wykazano m.in., że ogólna liczba drobnoustrojów w preparatach przeznaczonych dla dzieci w wieku 0-12 miesięcy nie przekroczyła 10^3 jtk/g, a w wieku 9-12 miesięcy i do trzeciego roku życia najwyższa ogólna liczba drobnoustrojów wynosiła 10^5 jtk/g badanej próbki. W czterech badanych próbkach wykryto obecność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, w żadnej próbce (w 1 g) nie wykryto obecności *E. sakazakii* (Stasiak-Róžańska i wsp. 2009, zał 4., III, B, 4; Stasiak-Róžańska i wsp. 2010, zał. 4, II, D, 18). Po rocznej przerwie w pracy, związanej z urodzeniem drugiego dziecka, kontynuowałam badania dotyczące **analizy mikrobiologicznej ziół i przypraw dostępnych na rynku polskim** (Dolińska i wsp. 2009, zał. 4, III, B,

3; Garbowska i wsp. 2015, zał. 4, II, A, 9). Do analizy mikrobiologicznej wybrano 60 próbek handlowych przypraw i ziół. We wszystkich próbkach oznaczono ogólną liczbę tlenowych bakterii mezofilnych oraz obecność pałeczek *Cronobacter* spp. W większości próbek przypraw i ziół (60%) liczba tlenowych bakterii mezofilnych nie przekraczała 10^4 cfu/g, a poziom uważany za niedopuszczalny ($>10^6$ jtk/g) nie został zidentyfikowany w żadnej z próbek. Obecność *Cronobacter* spp. wykazano w 10 próbkach analizowanych produktów, były to głównie próbki ziół (bazylia, estragon, pietruszka) i jedna próbka mieszanki przyprawowej (zioła prowansalskie). Najwyższe zanieczyszczenie mikrobiologiczne tlenowych bakterii mezofilnych stwierdzono wówczas w próbkach ziół (oregano, estragon, bazylia) oraz w gotowych mieszankach przyprawowych. We wszystkich próbkach nasion i owoców korzennych (kolendra, pieprz czarny i ziele angielskie) całkowita liczba bakterii tlenowych osiągnęła wartość $<10^4$ jtk/g (Dolińska i wsp. 2009, zał. 4, III, B, 3; Garbowska i wsp. 2015, zał. 4, II, A, 9). W kolejnych badaniach, dotyczących bakterii z rodzaju *Cronobacter*, podjęta została próba **oceny wpływu wybranych olejków eterycznych** (m.in. tymianku, cynamonu, goździków, mięty pieprzowej, majeranku, kminku, rozmarynu, kopru włoskiego, bazylii, limonki, bergamotki, pomarańczy) **na przeżywalność wybranych gatunków bakterii *Cronobacter*** (m.in. *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. condimenti* i *C. malonaticus*) (Berthold-Pluta i wsp. 2018, zał. 4, II, A, 6). Wykazano, że najbardziej skuteczne w hamowaniu wzrostu badanych gatunków były olejki z tymianku>cynamonu>majeranku (Berthold-Pluta i wsp. 2018, zał. 4, II, A, 6). Badania nad występowaniem bakterii z rodzaju *Cronobacter* w żywności umożliwiły mi podjęcie współpracy z wybitnym ekspertem w temacie izolowania i charakterystyki tych mikroorganizmów – profesorem Stephenem Forsythem z Nottingham Trent University, założycielem foodmicrobe.com, portalu poświęconego patogenom w żywności, ze szczególnym uwzględnieniem *Cronobacter* spp. Bezpośrednim wynikiem współpracy z prof. S. Forsythem było **zsekwencjowanie genomu** (draft genome sequence) ***C. condimenti* s37**, jednego z dwóch wyizolowanych do tej pory na świecie szczepów z tego gatunku. Szczep ten został wyizolowany przez dr inż. A. Berthold-Plutę i wsp. i opisany w publikacji, która ukazała się w 2017 roku w czasopiśmie Food Microbiology (DOI: 10.1016/j.fm.2017.03.005). Sekwencję szczepu s37 zdeponowano w GenBank pod numerem RQEO00000000.1

Moje obecne zainteresowania i działania naukowe nadal związane są z bakteriami octowymi. W 2016 roku wróciłam do pracy po kolejnej, rocznej przerwie, związanej z urodzeniem trzeciego dziecka, i od tamtej pory kontynuuję prace, obejmujące

m.in. przeniesienie na skalę bioreaktora opracowanej metody otrzymywania dihydroksy-acetonu z glicerolu odpadowego z zastosowaniem immobilizowanego preparatu komórkowego o aktywności katalitycznej dehydrogenazy glicerolowej. Pracuję również nad wyodrębnieniem DHA z mediów poreakcyjnych.

Prowadzę także **badania nad pozyskiwaniem i przemysłowym zastosowaniem celulozy bakteryjnej**. W ubiegłym roku byłam kierownikiem grantu przyznanego na realizację zadania badawczego (w ramach wewnętrznego trybu konkursowego SGGW) pt. **“Mikrobiologiczna utylizacja gliceryny odpadowej do dihydroksyacetonu i celulozy bakteryjnej z zastosowaniem wybranych szczepów bakterii octowych”** (zał. 4, II, I, 2). Nawiązałam współpracę naukową z dr Marią Gullo - ekspertką w dziedzinie fizjologii i biochemii bakterii octowych oraz nowoczesnych zastosowań celulozy bakteryjnej z University of Modena and Reggio Emilia z Włoch. Dr M. Gullo przekazała mi szczep *Komagataeibacter xylinus* K2G30 (z Unimore Microbial Culture Collection), który jest superproducentem celulozy bakteryjnej i jesteśmy w trakcie planowania badań, których celem jest **opracowanie mikrobiologicznej metody zagospodarowania odpadów przemysłu rolno-spożywczego w kierunku biosyntezy celulozy bakteryjnej oraz zastosowanie otrzymanej w ten sposób celulozy w różnych gałęziach przemysłu**. W 2020 roku będę opiekunem stażu naukowego doktorantki z L.N. Gumilyov Eurasian National University w Astana (Kazachstan), która przyjedzie na trzymiesięczny staż, poświęcony badaniom właściwości celulozy bakteryjnej. Doktorantka realizuje pracę doktorską pt. ”Isolation and research of effective producers of biocellulose” na Wydziale Nauk Przyrodniczych ww. Uniwersytetu.

W ubiegłym roku powróciłam do prac związanych z badaniem potencjalnych regulatorów transkrypcji u bakterii z rodzaju *Lactococcus*. Propozycja kontynuowania współpracy z dawnym zespołem badawczym z Zakładu Biochemii Drobnoustrojów IBB oraz możliwość pogłębienia wiedzy w zakresie badań genetycznych, a także perspektywa nabycia nowych umiejętności bioinformatycznych, zachęciły mnie do podjęcia starań o pozyskanie finansowania zaplanowanych działań eksperymentalnych. W 2018 roku otrzymałam grant MINIATURA 1 na **“Badania transkryptomu mutantu w genie *rgr*, kodującym potencjalny regulator transkrypcji u *Lactococcus lactis*”** (zał. 4, II, I, 3).

W ramach realizacji grantu MINIATURA 1 podjęłam badania, umożliwiające poznanie funkcji genu *rgr*, który koduje białko o potencjalnej funkcji regulatora transkrypcji u *L. Lactis* IL1403. Nie są znane molekularne podstawy działania genu *rgr* w odniesieniu do sygnałów niezbędnych dla jego aktywności, genów przez niego kontrolowanych jak również

sposobu ich kontroli. W podjętych badaniach przeprowadzona została całościowa analiza zmian poziomu ekspresji genów chromosomalnych, wywołanych delecją genu *rgr* i w odpowiedzi na różne sygnały (np. obecność wybranych cukrów w środowisku hodowlanym). Zmiany ekspresji genów chromosomalnych wywołanych brakiem białka Rgr były monitorowane globalnie w oparciu o analizę całogenomowych profili transkrypcyjnych (mikromacierze DNA). W tym celu przeprowadzona została izolacja RNA z komórek *L. lactis* (dzikiego szczepu oraz jego mutantu z usuniętym genem *rgr*) z fazy ich logarytmicznego wzrostu, hodowanych w obecności glukozy (cukier, którego metabolizm nie zależy od aktywności białka Rgr), maltozy i/lub jej pochodnych (cukry, których metabolizm jest Rgr-zależny). Na matrycy wyizolowanego RNA, przy pomocy odwrotnej transkryptazy (RT-PCR) syntetyzowano komplementarny jednoniciowy DNA. Do powstających cząsteczek DNA włączano znakowane nukleotydy, niosące fluorescencyjny barwnik cyjaninowy. Macierze (płytki zawierające 25-70 nukleotydowych sond dla genów chromosomu *L. lactis* IL 1403) hybrydyzowano z wyznakowanymi cząsteczkami kwasu nukleinowego, płukano, a obraz z mikromacierzy skanowano i przekształcano w zbiór danych wartości ekspresji dla każdej sondy. Analizę globalnych profili transkrypcyjnych zrealizowałam w Zakładzie Genetyki IBB PAN. W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że obecność każdego z zastosowanych cukrów, prowadziła do zmiany w poziomie ekspresji genów, wywołanych brakiem białka Rgr. Liczba zmian i ich rodzaj (podwyższenie lub obniżenie ekspresji genów) oraz intensywność, zależała od rodzaju cukru zastosowanego w hodowli bakterii. Wykazano, że w komórkach *L. lactis* IL 1403 białko Rgr pełni istotną funkcję, silnie aktywując lub reprimując transkrypcję około 50 niezależnych genów. Represja występowała w przypadku 23 z nich i najczęściej w obecności glukozy (20 genów), a aktywacja w przypadku 19 i najczęściej w obecności arbutyny (14 genów). Otrzymane wyniki wskazują, że nadrzędną rolą Rgr jest sterowanie ważnymi procesami, zaangażowanymi w biosyntezę nukleotydów i witamin oraz metabolizm niektórych cukrów. Spośród tych ostatnich, Rgr wpływa na procesy ich transportu przez błonę komórkową, wewnątrzkomórkową hydrolizę pobranego substratu oraz wybrane etapy glikolizy. Rgr może również uczestniczyć w dostrajaniu metabolizmu komórki nie tylko bezpośrednio, ale też poprzez kaskadową regulację. Badania przeprowadzone w ramach grantu NCN MINIATURA 1 oraz otrzymane wyniki zostały opisane w artykule naukowym, który zostanie skierowany do Redakcji czasopisma znajdującego się na liście JCR.

Moja współpraca z dr T. Aleksandrak-Piekarczyk z IBB PAN będzie kontynuowana w ramach przyznanego w 2018 roku grantu OPUS 15, pt. **” Charakterystyka determinantów**

genetycznych biosyntezy kwasu propionowego oraz analiza ich funkcjonalności w wybranych bakteriach fermentacji mlekowej” (zał. 4, II, I, 1), którego jestem wykonawcą. Kwas propionowy otrzymywany jest obecnie metodami chemicznymi. Mikrobiologiczna produkcja tego kwasu (choć nieporównywalnie bardziej przyjazna dla środowiska niż synteza chemiczna) jest niezwykle trudna do przeprowadzenia i przez to ekonomicznie nieopłacalna. Kwas propionowy wytwarzany jest przez bakterie z rodzaju *Propionibacterium*. Niestety, mikroorganizmy te rozmnażają się bardzo wolno, wymagają drożych i złożonych podłoży mikrobiologicznych i nie są odporne na kwas, który wytwarzają. Niezwykle trudno jest modyfikować geny bakterii propionowych. Wstępna analiza bioinformatyczna wykazała, że bakterie mlekowe z rodzaju *Lactococcus* mają wszystkie enzymy oraz kompletny potencjał genetyczny i metaboliczny potrzebny do wydajnej produkcji kwasu propionowego. Geny odpowiedzialne za biosyntezę tego związku w komórkach bakterii mlekowych prawie w ogóle nie są poznane, dlatego wiodącym celem realizowanego projektu będzie **dogłębna analiza genów występujących u *Lactococcus* i zaangażowanych w szlaki metaboliczne biosyntezy kwasu propionowego.**

W 2018 roku zostałam promotorem pomocniczym mgr inż. Joanny Cichowskiej, która pod naukowym kierunkiem prof. dr hab. Doroty Witrowej-Rajchert realizuje pracę doktorską pt. **“Analiza wpływu polioli jako substancji osmoaktywnych, ultradźwięków oraz pulsacyjnego pola elektrycznego na przebieg odwadniania osmotycznego i suszenia tkanki jabłka”**. W pracy tej wykorzystywana jest m.in. koncepcja zastosowania roztworów dihydroksyacetonu jako alternatywnego czynnika osmotycznego.

Oprócz opisanej działalności naukowo-badawczej, uczestniczyłam również w badaniach Współpracowników z Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności WNoŻ SGGW, które można podzielić na następujące obszary tematyczne:

- ⇒ Ocena zdolności biosyntezy tłuszczu oraz wzrostu wybranych rodzajów bakterii i drożdży w podłożach wzbogacanych glicerolem oraz produktami ubocznymi przemysłu rolno-spożywczego (zał. 4., II, A, 7; zał. 4, II, D, 28; zał. 4, II, D, 32; zał. 4, II, D, 33; zał. 4, II, D, 35; zał. 4, III, B, 13, zał. 4, III, B, 14; zał. 4, III, B, 15)

Efektom tych prac było opracowanie metody wykorzystującej niekonwencjonalne substraty, generowane przez przemysł rolno-spożywczy (w tym glicerol odpadowy oraz odpadową ziemniaczaną wodę sokową) do biosyntezy lipidów i karotenoidów m.in. przez drożdże z rodzajów *Rhodotorulla* i *Candida*.

- ⇒ Biosynteza egzopolisacharydów przez wybrane rodzaje drożdży (zał. 4, II, A, 8; zał. 4, II, D, 29)

Efektom tych prac było ustalenie możliwości zastosowania zewnątrzkomórkowych egzopolisacharydów wytwarzanych przez drożdże, jako składnika żywności, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli jako potencjalnego prebiotyku dla wybranych szczepów bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus*.

⇒ Ocena wybranych metod dezintegracji ścian komórkowych drożdży w procedurze pozyskiwania β -glukanów oraz wpływ wybranych czynników fizycznych i chemicznych na skład ściany komórkowej drożdży (zał. 4, II, A, 11; zał. 4, II, D, 34; zał. 4, III, B, 12; zał. 4, III, B, 16; zał. 4, III, B, 18)

Efektom tych prac było m.in. wskazanie alternatywnego kierunku biotechnologicznego wykorzystania ścian komórkowych i β -glukanów wybranych gatunków drożdży jako naturalnych biosorbentów (np. mykotoksyn).

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze, obejmujące m.in. udział w projektach badawczych, współpracę międzynarodową, udział w konferencjach naukowych, członkostwo w stowarzyszeniach, recenzje artykułów naukowych i inne, umieściłam w załączniku 4.

6. Omówienie działalności dydaktycznej oraz w zakresie popularyzacji nauki

Od roku 2007 realizuję zajęcia dla studentów Wydziału, na którym pracuję, na wszystkich oferowanych kierunkach studiów (technologia żywności i żywienie człowieka, towaroznawstwo, bezpieczeństwo żywności). Zajęcia dydaktyczne prowadzę także dla studentów Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu (kierunek biotechnologia). Wśród przedmiotów, które realizuję lub realizowałam znajdują się m.in.: ogólna technologia żywności, kierunkowa technologia żywności, mikrobiologia ogólna i żywności, modyfikacje genetyczne drobnoustrojów, technologia specjalizacyjna, pozyskiwanie i ulepszanie szczepów, fizjologia drobnoustrojów, biotechnologiczne wykorzystanie drobnoustrojów, drobnoustroje patogenne przenoszone przez wodę i żywność. Do tej pory byłam promotorem 4 prac magisterskich oraz 18 prac inżynierskich, a także opiekunem naukowym 4 prac magisterskich. Opracowałam autorski program wykładów z zakresu biotechnologicznego zastosowania bakterii octowych w przemyśle spożywczym, który kierowany jest do studentów II stopnia studiów na WNoŻ, kierunek technologia żywności i żywienie człowieka, dodatkowo opracowywałam wykłady z zakresu pozyskiwania i doskonalenia przemysłowych szczepów drobnoustrojów dla studentów II stopnia studiów zaocznych na tym samym kierunku. Opracowałam wiele konspektów, według których realizowane były ćwiczenia dla studentów WNoŻ oraz dla studentów Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu. Konspekty te obejmowały od 10 do 15 ćwiczeń laboratoryjnych

(3-4 godzinnych), uwzględniających zagadnienia m.in. z mikrobiologii ogólnej i żywności, modyfikacji genetycznych drobnoustrojów, pozyskiwania i ulepszania przemysłowych szczepów drożdży.

Moja działalność w zakresie popularyzacji nauki związana jest m.in. z pełnieniem funkcji Pełnomocnika Dziekana ds. Kontaktów ze Szkołami Średnimi (kadencja 2016/2019) i została szczegółowo opisana w załączniku 4, III, I. Podczas trwania kadencji wzięłam udział w zorganizowaniu i/lub współprowadzeniu ponad 40 spotkań z uczniami szkół ponadpodstawowych (i ponadgimnazjalnych). Spotkania odbywały się na terenie SGGW lub w placówkach dydaktycznych uczniów i obejmowały m.in. przeprowadzenie prezentacji uczelni, kierunków studiów oferowanych na WNoŻ SGGW w Warszawie, omówienie profilu poszczególnych kierunków, wskazanie uczniom możliwości zatrudnienia po ukończeniu studiów na WNoŻ, prezentację laboratoriów poszczególnych zakładów WNoŻ. Brałam aktywny udział w kolejnych edycjach z cyklu „Dzień Otwarty SGGW”.

Od 2012 roku jestem koordynatorem Festiwalu Nauki w ZBiMŻ. Funkcja ta związana jest z corocznym organizowaniem warsztatów laboratoryjnych dla dzieci i młodzieży ze szkół podstawowych i ponadpodstawowych, na których wraz z innymi Pracownikami Zakładu prezentujemy wiedzę i praktykę z zakresu mikrobiologii żywności.

W latach 2017 i 2018 brałam aktywny udział w aranżacji i obsłudze stoiska WNoŻ prezentowanego podczas międzynarodowych targów FOOD Expo. Biorę również aktywny udział w promowaniu Wydziału w ramach corocznych „Dni SGGW” - imprezy popularyzującej wiedzę i kierunki oferowane na naszej Uczelni. W roku 2017 byłam koordynatorem, a w roku 2018 osobą wspierającą koordynatora w przygotowaniach stoiska wydziałowego na Pikniku Naukowym Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik. Jako jedno z ważniejszych osiągnięć popularyzujących naukę chciałabym wymienić kierowanie projektem edukacyjnym, skierowanym do młodzieży z technikum w Opcznie z zakresu technologii żywności i analityki chemicznej (zał. 4, III, A, 1-4), a także prowadzenie autorskich warsztatów z mikrobiologii dla wybitnie uzdolnionej młodzieży, uczestników programu „Obóz Naukowy ADAMED SmartUp w SGGW” oraz „Innowacyjny Obóz Naukowy SmartUp” (zał. 4, III, A, 5-6).



Ostatnia strona autoreferatu